

Aus dem Institut für Biochemie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

# DISSERTATION

Die Wirkung des glykosidierten Phospholipids Inositol-C2-PAF  
auf die Transkriptionsfaktoren  
NF $\kappa$ B und STAT1  
in humanen Keratinozyten.

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

vorgelegt der medizinischen Fakultät  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Kremp

aus Berlin

Datum der Promotion: 18.12.2020



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	xi
Kurzfassung	xvii
Abstract	xix
1 Einleitung	1
1.1 Die Geschichte der Psoriasis	1
1.2 Klassifikation der Psoriasis	2
1.3 Begleiterkrankungen	3
1.4 Klinisches Bild und Histologie der <i>Psoriasis vulgaris</i>	3
1.5 Diagnostik	4
1.5.1 Bestimmung des Schweregrades mithilfe des PASI-Scores	4
1.5.2 Bestimmung des Schweregrades mithilfe des DLQI-Fragebogens	5
1.6 Epidemiologie	6
1.7 Ätiologie	6
1.7.1 Genetik	6
1.7.2 Umwelteinflüsse	7
1.8 Pathogenese	7
1.9 Der Transkriptionsfaktor NFκB	10
1.9.1 NFκB-Zelluläre Signalwege und Regulation	12
1.10 Der Transkriptionsfaktor STAT1	15
1.11 Therapiemöglichkeiten	17
1.11.1 Lokalthherapie	18
1.11.2 Phototherapie	18
1.11.3 Systemische Therapie	19

---

1.12	Das Konzept der Etherlipide . . . . .	19
1.12.1	Das glykosidierte Phospholipid Inositol-C2-PAF . . . . .	21
1.13	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	22
2	Materialien und Methoden . . . . .	25
2.1	Materialien . . . . .	25
2.1.1	Chemikalien . . . . .	25
2.1.2	Farbstoffe . . . . .	25
2.1.3	Sonstige Lösungen und Reagenzien . . . . .	25
2.1.4	Geräte . . . . .	26
2.1.5	Verbrauchsmaterialien . . . . .	27
2.1.6	Zellkulturmedien . . . . .	28
2.1.7	Puffer . . . . .	29
2.1.8	Acrylamidgele 7,5% für SDS-Page . . . . .	30
2.1.9	Inhibitoren . . . . .	31
2.1.10	Zell-Linie . . . . .	31
2.1.11	Zytokine . . . . .	32
2.1.12	Antikörper . . . . .	33
2.1.13	Proteinmarker . . . . .	34
2.1.14	Software und Datenbanken . . . . .	35
2.1.15	Statistik . . . . .	35
2.2	Methoden . . . . .	35
2.2.1	Zellbiologische Techniken . . . . .	35
2.2.2	Zellgewinnung . . . . .	38
2.2.3	Proteinbestimmung . . . . .	39
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	39

---

3	Ergebnisse	43
3.1	Untersuchungen zum Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B . . . . .	43
3.1.1	Der Einfluss von IL-6 auf die Expression der p105-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF in humanen Keratinozyten <i>in vitro</i> im Western Blot-Verfahren . . . . .	43
3.1.2	Der Einfluss von IL-6 auf die Expression der p50-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF . . . . .	47
3.1.3	Untersuchungen zum Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Verteilung der NF $\kappa$ B p105-Untereinheit zwischen Zytosol und Zellkern . . . . .	50
3.1.4	Untersuchungen zum Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Verteilung der NF $\kappa$ B p50-Untereinheit zwischen Zytosol und Zellkern . . . . .	52
3.1.5	Der Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B p105/p50 mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse . . . . .	55
3.1.6	Der Einfluss von IL-6 auf die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$ in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF . . . . .	57
3.1.7	Der Einfluss von IL-6 auf die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF . . . . .	58
3.2	Untersuchungen zum Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Transkriptionsfaktor STAT1 . . . . .	60
3.2.1	Der Einfluss von IFN $\gamma$ auf die Expression des Transkriptionsfaktors STAT1 in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF in humanen Keratinozyten <i>in vitro</i> im Western Blot-Verfahren . . . . .	60
3.2.2	Untersuchungen zum Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Verteilung des Transkriptionsfaktors STAT1 innerhalb der Zelle . . . . .	63

---

3.2.3	Untersuchungen zum Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Verteilung des Transkriptionsfaktors STAT1 im Zellkern	66
3.2.4	Der Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors STAT1 mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse . . . . .	69
4	Diskussion	71
4.1	Die Western Blot-Methode als Nachweismethode zur Beurteilung der Wirkung von Inositol-C2-PAF in humanen Keratinozyten . . . . .	72
4.2	Die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf humane Keratinozyten <i>in vitro</i> .	72
4.3	Die Wirkung von IL-6 und Inositol-C2-PAF auf die Aktivität von NFκB p50/p105 in humanen Keratinozyten . . . . .	74
4.4	Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Lokalisation von IκBα und pIκBα in humanen Keratinozyten . . . . .	78
4.5	Der Einfluss von IFNγ und Inositol-C2-PAF auf STAT1 in humanen Keratinozyten im Western Blot-Versuch und der Immunfluoreszenz-Analyse	80
	Literaturverzeichnis	85
	Eidesstattliche Erklärung	107
	Curriculum Vitae	109
	Danksagung	111

# Tabellenverzeichnis

1.1	Einteilung der Psoriasis-Formen nach (Sterry (2004)) . . . . .	2
1.2	Therapiemöglichkeiten der <i>Psoriasis vulgaris</i> (Moll (2010a)) . . . . .	18
2.1	Farbstoffe . . . . .	25
2.2	Sonstige Lösungen und Reagenzien . . . . .	25
2.2	Sonstige Lösungen und Reagenzien - Fortsetzung . . . . .	26
2.3	Geräte . . . . .	26
2.3	Geräte - Fortsetzung . . . . .	27
2.4	Verbrauchsmaterialien . . . . .	27
2.4	Verbrauchsmaterialien - Fortsetzung . . . . .	28
2.5	Zellkulturmedien . . . . .	28
2.6	Puffer . . . . .	29
2.6	Puffer - Fortsetzung . . . . .	30
2.7	Acrylamidgele 7,5% für SDS-Page . . . . .	30
2.7	Acrylamidgele 7,5% für SDS-Page - Fortsetzung . . . . .	31
2.8	Protease-Inhibitoren . . . . .	31
2.9	Phosphatase-Inhibitoren . . . . .	31
2.10	Zytokine . . . . .	32
2.11	Primär-Antikörper . . . . .	33
2.12	Western Blot-Analyse . . . . .	34
2.13	Immunfluoreszenz-Analyse . . . . .	34
2.14	Proteinmarker . . . . .	34
2.15	Software und Datenbanken . . . . .	35



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Klinische Zeichen der <i>Psoriasis vulgaris</i> (Moll (2010b)) . . . . .	4
1.2	Histologie psoriatischer im Vergleich zu gesunder Haut (Wagner et al. (2010)) . . . . .	5
1.3	Schematische Darstellung der NF $\kappa$ B-Proteine (Jost (2006)) . . . . .	12
1.4	Schematische Darstellung der Proteine der I $\kappa$ B-Familie (Jost (2006)) . .	13
1.5	Schematische Darstellung der I $\kappa$ B-Kinase-Komplexe (IKK) (Jost (2006))	14
1.6	Schematische Darstellung des kanionischen NF $\kappa$ B-Signalweges (Jost (2006)) . . . . .	15
1.7	Schematische Darstellung des alternativen NF $\kappa$ B-Signalweges (Jost (2006)) . . . . .	16
1.8	Schematische Darstellung des STAT1-Signalweges (Katze et al. (2002))	17
1.9	Strukturformel von Edelfosin® (ET-18-OCH <sub>3</sub> ) . . . . .	20
1.10	Strukturformel von Miltefosin® (Hexadecylphosphocholin) . . . . .	21
1.11	Strukturformel des plättchenaktivierenden Faktors PAF (1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glycero-3-phosphatcholin) . . . . .	21
1.12	Strukturformel von Inositol-C2-PAF . . . . .	22
2.1	HaCaTs . . . . .	32
2.2	Prinzipieller Versuchsaufbau zur Behandlung der HaCaT-Zellen in den beschriebenen Experimenten . . . . .	37
2.3	Prinzipieller Versuchsaufbau für den indirekten Immunfluoreszenz-Versuch . . . . .	40
3.1	Die Expression des Proteins NF $\kappa$ B p105 in HaCaT-Zellen im Western Blot nach einer Inkubation über 15min. . . . .	44

---

3.2	Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der Expression von NFκB p105 nach 15min. . . . .	45
3.3	Die NFκB p105-Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot nach einer Inkubation über 24h und 48h. . . . .	46
3.4	Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der Expression von NFκB p105 nach 24h und 48h. . . . .	46
3.5	Graphische Zusammenfassung der NFκB p105-Expression über den zeitlichen Verlauf von 15min bis hin zu 48h Inkubation mit dem Zytokin IL-6 (10ng/ml) und Inositol-C2-PAF (5μM). . . . .	47
3.6	Die Expression der NFκB p50-Untereinheit in HaCaT-Zellen im Western Blot nach einer Inkubation über 15min und 60min. . . . .	48
3.7	Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der Expression von NFκB p50 nach 15min und 60min. . . . .	49
3.8	Die NFκB p50-Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot nach einer Inkubation über 24h und 48h. . . . .	49
3.9	Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der Expression von NFκB p50 nach 24h und 48h. . . . .	50
3.10	Graphische Zusammenfassung der NFκB p50-Expression über den zeitlichen Verlauf nach Inkubation mit dem Zytokin IL-6 (10ng/ml) in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5μM). . . . .	51
3.11	Die NFκB p105-Expression in der zytosolischen und nukleären Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot-Versuch nach Inkubation über 24h. . . . .	52
3.12	Quantifizierung des Western Blot-Versuchs zum Nachweis der NFκB p105-Expression in der zytosolischen Fraktion nach 24h. . . . .	53
3.13	Die NFκB p50-Expression in der zytosolischen und nukleären Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h. . . . .	54
3.14	Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der NFκB p50-Expression in der zytosolischen und nukleären Fraktion nach 24h. . . . .	55
3.15	Die quantifizierte zytosolische und nukleäre Fraktion der NFκB p50-Expression der Western Blot-Versuche nach 24h im direkten Vergleich. . . . .	55
3.16	Die Expression von NFκB p105/p50 in HaCaT-Zellen im Immunfluoreszenz-Versuch nach 24h Die Zellen wurden mit IL-6 (20ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (2,5μM) für 24h inkubiert. . . . .	56

---

3.17 Die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h und 48h. . . . .	57
3.18 Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Expression nach 24h und 48h. . . . .	58
3.19 Der Phosphorylierungsstatus von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h. . . . .	59
3.20 Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der $\text{pI}\kappa\text{B}\alpha$ -Expression nach 24h. . . . .	59
3.21 Die STAT1-Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot-Versuch nach 15min und 60min. . . . .	61
3.22 Die STAT1-Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot-Versuch nach 24h und 48h. . . . .	62
3.23 Quantifizierung der Western Blots zum Nachweis der STAT1-Expression nach 15min, 60min, 24h und 48h. . . . .	62
3.24 Graphische Zusammenfassung der gezeigten Versuche über den zeitlichen Verlauf von 15min bis zu 48h Inkubation mit dem Zytokin $\text{IFN}\gamma$ (10ng/ml) und Inositol-C2-PAF (5 $\mu\text{M}$ ). . . . .	63
3.25 Die STAT1-Expression in der zytosolischen Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 15min und 60min. . . . .	64
3.26 Die STAT1-Expression in der zytosolischen Fraktion von HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h und 48h. . . . .	64
3.27 Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der STAT1-Expression in der zytosolischen Fraktion nach 15min, 60min, 24h und 48h. . . . .	65
3.28 Die STAT1-Expression in der nukleären Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot-Versuch nach 15min und 60min. . . . .	66
3.29 Die STAT1-Expression in der nukleären Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h und 48h. . . . .	67
3.30 Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der STAT1-Expression in der nukleären Fraktion nach 15min, 60min, 24h und 48h. . . . .	68
3.31 Die quantifizierte zytosolische und nukleäre Fraktion der STAT1-Expression der Western Blot- Versuche nach 15min, 60min, 24h und 48h. . . . .	69

3.32 Die Expression von STAT1 in HaCaT-Zellen im indirekten Immunfluoreszenz-Versuch nach 24h. . . . . 70

# Abkürzungsverzeichnis

**2D** 2 dimensional

**ACE** Angiotensin Converting Enzyme

**ad** aqua dest.

**AMP** antimikrobielles Peptid

**BD** bindende Domäne

**BCA** Bicinchoninsäure

**BTH** Benzothiophen-2-yl-3-bromo-5-hydroxy-5-Hydrofuran-2-one

**BSA** bovines Serumalbumin

**C** Grad Celsius

**CC** Coiled-Coil-Domänen

**CCL2** CL-Chemokin-Ligand-2

**CD4** cluster of differentiation 4

**DLQI** dermatologische Lebensqualitätsindex

**DMSO** Dimethylsulfoxid

**DNA** Desoxyribonukleinsäure

**DTT** Dithiothreitol

**EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure

**EGFR** Epidermal Growth Factor Receptor

**FCS** fetales Kälberserum

**h** Stunde

**HaCaT** human adult low calcium high temperature keratinocytes

**HaCaT/CLS** human adult low calcium high temperature keratinocytes/cell lines  
service

**HCl** Chlorwasserstoff

**HLA** humanes Leukozytenantigen

**HLH** Helix-Loop-Helix-Region

**IF** Immunfluoreszenz

**IFN** Interferon

**IKK** IkappaB-Kinase Komplex

**IL** Interleukin

**JAK** Januskinase

**JNK** Jun-terminale Kinase

**KCl** Kaliumchlorid

**KOH** Kaliumhydroxid

**LPC** Lysophosphahtidylcholin

**LZ** Leucin-Zipper

**max.** maximal

**mA** Milliampere

**MAPK** Mitogen-Activated-Protein-Kinase

- 
- MAP** Mitogen-Activated-Protein
- mg** Milligramm
- MG** Proteasominhibitor
- MHC** major histocompatibility complex
- min** Minute
- ml** Milliliter
- mM** Millimolar
- mRNA** messenger Ribonukleinsäure
- MTX** Methotrexat
- Na** Natrium
- NaCl** Natriumchlorid
- Na(OH)** Natriumhydroxid
- NBD** NEMO-bindende Domäne
- ng** Nanogramm
- NIK** NfkappB-Including-Kinase
- NLS** Kern-Lokalisationssignal
- nm** Nanometer
- NP40** Nonoxinol 40
- OSM** Oncostatin M
- P/S** Penicillin/Steptomycin
- PAF** Plättchen-aktivierender Faktor

*pH* potentia Hydrogenii

*PASI* Psoriasis Area and Severity Index

*PBS* phosphat-bufered saline

*PIAS* protein inhibitor of activated STAT

*PIC* Protease Inhibitor Cocktail

*PI3K* Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Weg

*PMSF* Phenylmethylsulfonylfluorid

*POD* Peroxidase

*PSORS* Suszeptibilitätsloci

*RHD* Rel-Homologie-Domäne

*RNA* Ribonukleinsäure

*rpm* rounds per minute

*RPMI* Roswell Park Memorial Institute

*RT* Raumtemperatur

*SDS* sodium dodecyl sulfate

*SDS-Page* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

*Ser* Serin

*SFM* Serum Free Medium

*SH* Src-homology

*sn2* stereospecific numbering 2

*sn3* stereospecific numbering 3

**SOCS** Suppressors of Cytokine Signaling

**STAT** signal transducers and activators of transcription

**TAD** Transaktivierungsdomäne

**TBS** tris-buffered saline

**Thr** Threonine

**TLR** Toll-Like-Rezeptor

**USA** United States of America

**UK** United Kingdom

**UV** ultraviolett

**V** Volt

**WB** Western Blot



# Kurzfassung

Die *Psoriasis vulgaris* ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung. Die Ursache dieser Erkrankung ist bislang nicht eindeutig geklärt. Der Deutsche Psoriasis Bund teilte anlässlich des Welt-Psoriasis-Tags im Jahre 2013 mit, dass nach Schätzungen von Experten etwa ein Viertel (24%) der Menschen, die an Psoriasis leiden, nicht mehr zu einem Arzt gehen, da sie mit der Behandlung unzufrieden sind. Kritisiert werden mangelnde Kenntnisse über Ausmaß und Therapie der Erkrankung bei den Ärzten und Patienten. Aufgrund bisher immer noch fehlender Heilungsmöglichkeiten der Psoriasis, gilt es, weiter nach alternativen Behandlungsoptionen zu forschen. Dieses stellt den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar. Inositol-C2-Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) gehört zu den glykosidierten Phospholipiden, die eine neuartige Untergruppe der synthetischen Etherlipide darstellen. Etherlipide fanden bisher nur Anwendung in der Tumorthherapie, doch konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass sie auch einen Effekt auf chronisch entzündlich ablaufende Prozesse haben könnten. Diese Arbeit befasst sich mit dem Einfluss des Etherlipids Inositol-C2-PAF auf die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und sein Regulatormolekül I $\kappa$ B $\alpha$ , sowie dem Transkriptionsfaktor STAT1, in einem epidermalen 2D-Modell humaner Keratinozyten (HaCaT). Mithilfe von Western Blot-Analysen sowie der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse sollte untersucht werden, ob Inositol-C2-PAF einen Einfluss auf die Expression und die Translokation der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und STAT1 in den Zellkern und die damit verbundene Aktivierung der Genexpression hat. Dafür wurden die HaCaT-Zellen mit den Zytokinen IL-6 oder IFN $\gamma$  in An- bzw. Abwesenheit von Inositol-C2-PAF stimuliert und über unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Die Wirksamkeit sollte auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht werden. Ein signifikanter Effekt von Inositol-C2-PAF auf den NF $\kappa$ B-Signalweg und die damit verbundenen Komponenten konnte nicht ausreichend belegt werden. In den Western Blot-Versuchen mit den einfachen Soluten um den Transkriptionsfaktor STAT1 lässt sich ein möglicher Effekt durch

Inositol-C2-PAF nach 24h beobachten. Dieser Effekt lässt sich deutlicher nach Kern-Zytosol-Trennung in der nukleären Fraktion erkennen. Nach einer Stimulation über 15min bis zu 24h zeigt sich eine Reduktion des Transkriptionsfaktors STAT1 durch die gleichzeitige Stimulation mit IFN $\gamma$  und Inositol-C2-PAF. Dieses Bild konnte in der indirekten Immunfluoreszenz bestätigt werden. Es liess die Tendenz erkennen, dass der Transkriptionsfaktor STAT1 nach Stimulation mit IFN $\gamma$  in den Zellkern transloziert und mit gleichzeitiger Gabe von Inositol-C2-PAF an der Translokation in den Zellkern gehemmt wird. Dies lässt vermuten, dass Inositol-C2-PAF nicht nur ein geeigneter Wirkstoff-Kandidat für die Behandlung von Tumorerkrankungen ist, sondern auch in der Behandlung chronisch inflammatorischer Erkrankungen, wie der Psoriasis, zum Einsatz kommen könnte.

# Abstract

*Psoriasis vulgaris* is a chronic inflammatory disease and to date, the cause of this disease is not clearly understood. According to the German Psoriasis Association in 2013, 24% of patients who suffer from psoriasis are no longer visiting a doctor because they are highly unsatisfied with their treatment. Little knowledge about the dimension and the treatment of the disease are frequent points of criticism from doctors and patients. Therapies to cure psoriasis are still missing. Therefore, there is an urgent need to find novel treatment options which is also the focus of the present work. Inositol-C2-PAF belongs to the glycosidated phospholipids, which represent a subgroup of synthetic ether lipids. So far, etherlipids are used in cancer therapy, but it had already been shown that they might have an impact on chronic inflammatory processes as well. This work is about the influence of the ether lipid Inositol-C2-PAF on the transcription factor NF $\kappa$ B and its regulator molecule I $\kappa$ B $\alpha$  as well as on the transcription factor STAT1, in a 2D epidermal model of human keratinocytes (HaCaT). Western blot analysis and indirect immunofluorescence analysis are used to investigate whether Inositol-C2-PAF has an influence on the expression and translocation of the transcription factors NF $\kappa$ B and STAT1. For this purpose HaCaT cells are stimulated with the cytokines IL-6 or IFN $\gamma$  with or without Inositol-C2-PAF, and incubated for different periods of time. The effect was investigated at the cellular and molecular level. A significant effect of Inositol-C2-PAF on the transcription factor NF $\kappa$ B and associated components could not be shown. Using western blot analysis with a simple solubilisate, a possible effect of Inositol-C2-PAF on the expression of the transcription factor STAT1 after 24h was observed. This effect is even more significant the nuclear fraction. After stimulation for 15min to 24h, the transcription factor STAT1 decreases in the presence of IFN $\gamma$  and Inositol-C2-PAF. This observation could also be confirmed using indirect immunofluorescence analysis. There was a clear tendency that the transcription factor STAT1 translocates into the nucleus after stimulation.

When added simultaneously, Inositol-C2-PAF inhibited this translocation. The given results suggests that Inositol-C2-PAF might also be a promising compound for the treatment of chronic inflammatory diseases such as psoriasis.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Geschichte der Psoriasis

Die ersten Beschreibungen der sogenannten Schuppenflechte finden sich bereits im alten Testament; doch blieb dieses Bild bis zum Ende des 18. Jahrhunderts sehr diffus. Erst Robert Willan, ein britischer Dermatologe, beschrieb im Jahre 1808 das klinische Bild der Psoriasis mit „dünnen weißen Fäden“, in „der Größe eines Silerpennings“, von „scheibenrunder oder ovaler Gestalt“, „mit trockenen Schuppen bedeckt und mit einem roten Rande umgeben“ und versuchte damit eine erste, wenn auch in den Augen anderer, eher mittelmäßige Abgrenzung zur damals sehr gefürchteten Lepra (Saalman (1998)).

1860 wurde diese Beschreibung von einem Kollegen Willans, dem Österreicher Ferdinand von Hebras, mit folgenden Worten stark kritisiert: „Die einzelnen Effloreszenzen stehen im Beginne der Erkrankung stets isoliert und treten erst im weiteren Verlauf näher aneinander oder sie verschmelzen ganz miteinander. Bei der Psoriasis ist zwar meistens die ganze Haut an verschiedenen Punkten Sitz der Erkrankung, mit besonderer Prädilektion der Ellenbogen und Knie, aber gewöhnlich sind die inselförmig zerstreuten Effloreszenzen durch größere oder kleinere gesunde Hautpartien von einander getrennt...“ (Saalman (1998)). Seine vorgeschlagene „Klassifikation“ der Hautkrankheiten setzte sich rasch durch (Saalman (1998)).

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass es sich bei der *Psoriasis vulgaris* um eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut handelt, die familiär gehäuft auftritt, aber auch durch verschiedene Umwelteinflüsse, wie Rauchen, Medikamente und Infekte, ausgelöst werden kann.

Die Erkrankung begleitet einen Menschen nach Ausbruch sein Leben lang und gilt bis heute als nicht heilbar.

## 1.2 Klassifikation der Psoriasis

Im Laufe der Zeit wurde versucht, die Psoriasis anhand ihres Phänotyps zu unterscheiden. Der Übergang der verschiedenen Formen ist jedoch fließend und auch Mischformen sind möglich. Die Tabelle 1.1 zeigt die Einteilung nach (Sterry (2004)).

<i>Psoriasis vulgaris</i>	Chronisch-stationäre Psoriasis (Plaquetyp), <i>Psoriasis guttata</i> (Exanthemische Psoriasis), <i>Psoriasis intertriginosa</i> , <i>Psoriasis inversa</i> , <i>Psoriasis erythrodermatica</i>
<i>Psoriasis pustulosa</i>	<i>Psoriasis pustulosa palmoplantaris</i> (Barber), <i>Acrodermatitis continua suppurative</i> (Hallopeau), Anuläre <i>Psoriasis pustulosa</i> ( <i>Erythema anulare centrifugum cum pustulatione</i> )
<i>Psoriasis pustulosa</i> in der Schwangerschaft ( <i>Impetigo herpetiformis</i> )	
<i>Psoriasis pustulosa generalisata</i> (von Zumbusch)	
Arzneimittelinduzierte Psoriasis und psoriasiforme Arzneimittelexantheme, psoriatische Osteoarthropathie	

**Tabelle 1.1:** Einteilung der Psoriasis-Formen nach (Sterry (2004))

In einer älteren Einteilung wurde versucht, zu unterscheiden zwischen der Psoriasis Typ 1 mit der Erstmanifestation der Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr, genetischer Disposition und schwerem Verlauf, sowie der Psoriasis Typ 2 mit der Erstmanifestation nach dem 40. Lebensjahr, fehlender genetischer Disposition und milderem Verlauf (Henseler (1995)). Aktuell wird die *Psoriasis vulgaris* nach ihren Hauterscheinungen

unterschieden. Grundlage hierfür ist die Ausprägung der Läsionen, sowie dem weiteren Verlauf der Krankheit, so dass man die akut eruptive Variante von dem chronisch stationären Typ trennt (Griffiths et al. (2007), Nast et al. (2011)).

### 1.3 Begleiterkrankungen

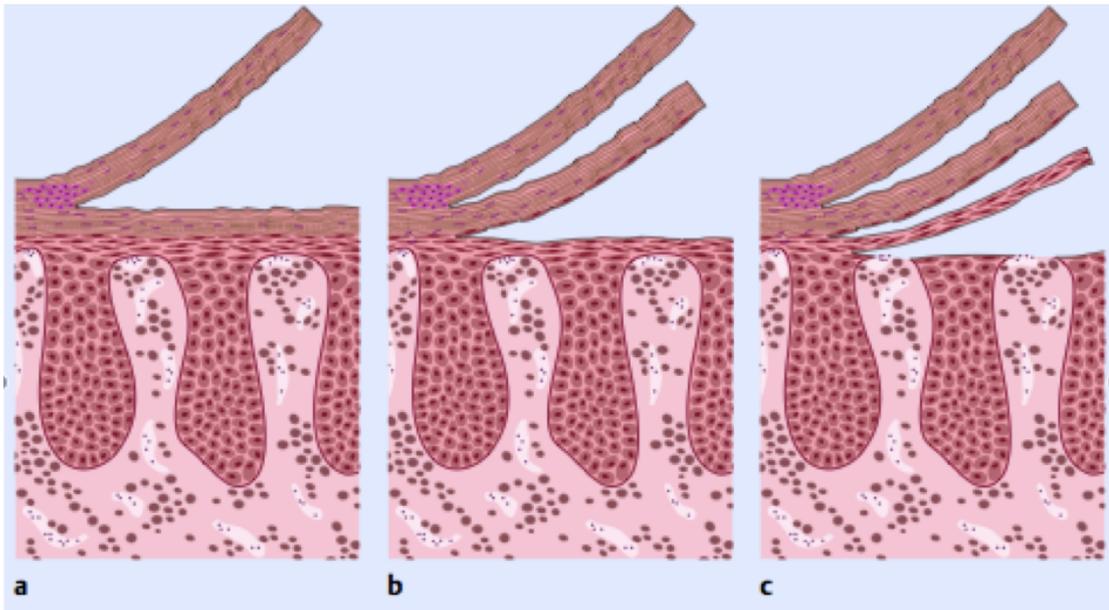
Bei Psoriasis-Patienten sind weitere systemische Erkrankungen, die durch die Psoriasis bedingt sind, zu beobachten. Dazu gehören Gelenkbeteiligungen (Psoriasis-Arthritis), chronisch-entzündliche Erkrankungen (rheumatoide Erkrankung), chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und metabolische Veränderungen wie Fettstoffwechsel-Störungen, Diabetes-Neigung, Adipositas und arterielle Hypertonie (Augustin et al. (2010)). Damit erhöht sich vor allem bei jungen Menschen mit einer schweren Ausprägungsform der Psoriasis das Risiko an einem kardiovaskulären Ereignis, wie einem Herzinfarkt oder Schlaganfall zu erkranken, woraus eine erhöhte Mortalität resultiert mit einer herabgesetzten Lebenserwartung um drei bis vier Lebensjahre (Gelfand et al. (2007)). Auch Depressionen (Egeberg (2016)) und eine erhöhte Suchtneigung scheinen ebenfalls häufiger bei den Patienten aufzutreten (Nast et al. (2017)).

### 1.4 Klinisches Bild und Histologie der *Psoriasis vulgaris*

Durch gestörte und zu schnelle Differenzierung der Haut zeigen sich scharf begrenzte erythemato-squamöse Plaques mit aufsitzender, nicht fest haftender silbrig-weiß grober Schuppung, die durch teilweise starken Juckreiz charakterisiert sind. Die für die *Psoriasis vulgaris*, typischen Prädilektionsstellen sind Kapillitium, äußerer Gehörgang, Knie- und Ellenbogenregion, Sakralregion und die Nägel.

Zu den ebenfalls typisch klinischen Befunden gehört das sogenannte „Kerzentropfen-Phänomen“ (Abbildung 1.1a), das „Phänomen des letzten Häutchens“ (Abbildung 1.1b), „der blutige Tau“ (auch das „Auspitz-Phänomen“ genannt) (Abbildung 1.1c) und die Ölflecken oder Tüpfel an den Nägeln, sowie das sogenannte Köbner-Phänomen nach Reizung der Haut (Moll (2010b)).

Histologisch zeigen sich sogenannte Munro-Mikroabzesse, die durch Einwanderung neutrophiler Granulozyten in Epidermis und Dermis bedingt sind. Die parallel ablaufen-



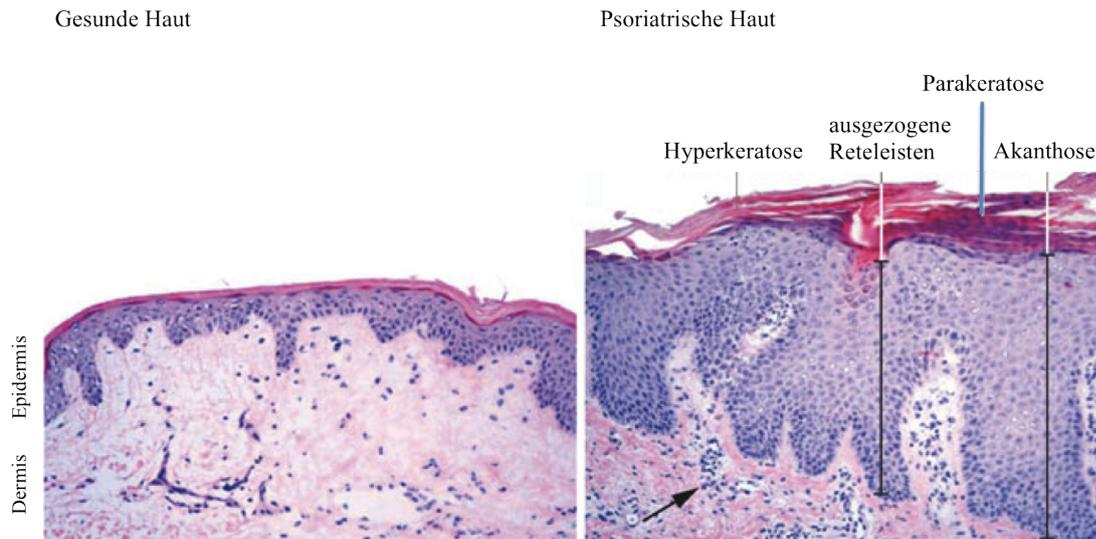
**Abbildung 1.1:** Klinische Zeichen der *Psoriasis vulgaris* (Moll (2010b))

de Hyperproliferation zeigt sich durch eine ausgeprägte Verdickung des Epithels (Akanthose) mit ausgezogenen Reteleisten. Das *Stratum granulosum* fehlt aufgrund der überschneidenden Reifung der Keratinozyten während das *Stratum corneum* durch die erhöhte proliferative Aktivität und gestörte Ausreifung der Keratinozyten verdickt ist (Hyperparakeratose) (Nestle et al. (2009), Nast et al. (2017)) (Abbildung 1.2).

## 1.5 Diagnostik

### 1.5.1 Bestimmung des Schweregrades mithilfe des PASI-Scores

Um den Schweregrad der Psoriasis schnell und vergleichend zu ermitteln, kann der *Psoriasis Area and Severity Index (PASI)* herangezogen werden (Mrowietz et al. (2010)). Insgesamt kann dabei eine maximale Punktzahl von 72 erreicht werden. Zur Ermittlung des Scores werden die Symptome Erythem (Rötung), Infiltration (Plaquedicke) und Schuppung beurteilt. Eine Rolle spielt dabei ebenfalls die Größe und Ausprägung der genannten Symptome auf den betroffenen Körperoberflächen, wie Kopf, Rumpf, Arme und Beine. Liegt der PASI < 10 spricht man eher von einer leichten Psoriasis-Erkrankung. Liegt der PASI oberhalb von 10 ist dies als mittelschwere bis



**Abbildung 1.2:** Histologie psoriatischer im Vergleich zu gesunder Haut (Wagner et al. (2010))

schwere Erkrankung definiert (Mrowietz et al. (2010)).

### 1.5.2 Bestimmung des Schweregrades mithilfe des DLQI-Fragebogens

Das Auftreten von Veränderungen der Haut, wie im Falle der Psoriasis kann die Lebensqualität eines Menschen erheblich beeinflussen und für die Betroffenen eine große Belastung darstellen. Um Aussagen über die Lebensqualität zu machen, kann der dermatologische Lebensqualitätsindex (DLQI) in Form eines Fragebogens hilfreich sein. Dieser wurde im Jahre 1994 vor allem für Kinder und Jugendliche über 16 Jahren mit einem chronischen Hautleiden entwickelt. Zu Beginn war der Test lediglich in englischer Sprache erhältlich, doch mittlerweile ist er auch in einer deutschen Ausführung zu bekommen. Bezogen auf die letzten sieben Tage müssen zehn Fragen beantwortet werden, die sich vor allem auf die psychosozialen Folgen in Leben und Alltag konzentrieren.

Dabei werden folgende Bereiche abgedeckt (Radtke et al. (2009), Mrowietz et al. (2010), Ali et al. (2016), Atwan et al. (2017), Nast et al. (2017)):

1. Symptome/Gefühle
2. tägliche Aktivität
3. Freizeit
4. Arbeit/Schule
5. persönliche Beziehungen
6. Auswirkungen der Behandlung auf den Alltag

Die maximale Punktzahl beträgt 30 und mit der Höhe des Wertes steigt die Einschränkung der Lebensqualität des Menschen an. Liegt der Wert  $\geq$  (größer/ gleich) 10 so spricht man von einer mittelschweren bis schweren Einschränkung (Mrowietz et al. (2010)).

Der PASI-Score und der DLQI-Index eignen sich sehr gut zur Definition von Therapiezielen.

## 1.6 Epidemiologie

Die *Psoriasis vulgaris* ist eine auf der ganzen Welt vorkommende Erkrankung, die eine unterschiedliche Häufigkeit je nach ethnischer Zugehörigkeit aufweist. Die häufigste Form zeigt in Deutschland eine Prävalenz von 2-3%, womit insgesamt etwa 1,5 Millionen Menschen betroffen sind (Ferrándiz et al. (2001), Augustin et al. (2010)). Dabei weisen Männer und Frauen diese Erkrankung zu gleichen Teilen auf (Fry (1988)).

## 1.7 Ätiologie

### 1.7.1 Genetik

Die *Psoriasis vulgaris* ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der nicht nur genetische Faktoren eine Rolle spielen. Auch Umwelteinflüsse können in der Pathogenese zum

Tragen kommen (Nast et al. (2011)). Die genetische Komponente der *Psoriasis vulgaris* ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Diese spielt jedoch eine wichtige Rolle, welche sich durch die Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen mit 30-50% und bei zweieiigen Zwillingen mit 10-20% widerspiegelt. Zudem liegt das Risiko zu erkranken bei 10-15%, wenn ein Elternteil an Psoriasis leidet und bei 30-40%, wenn beide Elternteile betroffen sind (Harden et al. (2015)). Bis heute konnten 9 spezifische Gene bzw. sogenannte Suszeptibilitätsloci identifiziert werden, PSORS 1-9 (Capon et al. (2004)), unter denen PSORS 1 auf dem kurzen Arm des Chromosom 6, das bisher wichtigste Gen darstellt und besonders häufig beim Psoriasis Typ 1 gefunden wird. Dieses Chromosom enthält die HLA-Gene, wovon das HLA-Cw6-Allel die größte Bedeutung für die Erkrankung zu haben scheint (Valdimarsson (2007)). Bei der Psoriasis Typ 2 zeigt sich eine hohe Assoziation zum HLA-Cw2-Allel und zum HLA-B27-Allel. Das benannte Gen PSORS-1 spielt hier keine erwähnenswerte Rolle (Henseler (1997), Allen et al. (2005)).

### 1.7.2 Umwelteinflüsse

Auch Umweltfaktoren können einen Einfluss auf die Erstmanifestation und späteren Exazerbationen der betroffenen Person haben. Dazu gehören z.B. Infektionen, psychischer Stress, mechanische Reizung (Köbner-Phänomen), Medikamente, wie  $\beta$ -Blocker, Lithium, Antimalariamedikation und ACE-Hemmer, sowie die Ernährung. Auch das Rauchen soll einen negativen Effekt auf das Hautbild eines Psoriatikers haben (Lønneberg et al. (2015)).

## 1.8 Pathogenese

Bis heute ist die Pathogenese immunologisch nicht abschließend geklärt. Man geht aber mittlerweile davon aus, dass die Psoriasis eine Autoimmunerkrankung ist, deren Bild durch die Aktivität der T-Zellen beherrscht wird (Christophers (2003), Hengge (2006), Lowes et al. (2014)). Belege für diese Vermutung finden sich in der Behandlung der Psoriasis. Medikamente, wie Cyclosporin A, blockieren erfolgreich die T-Zellen und hemmen die Interleukin-Produktion (Müller (1981), Tigalonowa et al. (1989), Cai et al. (2012)). Auch Methotrexat (MTX), das ebenfalls die Aktivität der T-Zellen reduziert (Genestier et al. (1998), Chan (2013)), bestätigt das Bild der T-Zell-vermittelten Au-

toimmunerkrankung. Nach allogener Knochenmarkstransplantation gesunder Spender kam es bei erkrankten Empfängern zur Abheilung der Psoriasis. Umgekehrt führte die allogene Knochenmarkstransplantation kranker Spender zum Ausbruch der Erkrankung bei gesunden Empfängern (Yokota et al. (1996), Adkins et al. (2000), Bos (2007)).

Außerdem werden bestimmte Streptokokken-Antigene (M-Protein) nach vorausgegangener Streptokokken-Infektion als Krankheitsauslöser diskutiert. Primär kommt es dabei zur Bildung von T-Gedächtniszellen, die normalerweise bei einer erneuten Infektion zum Einsatz kommen und für eine schnellere Eliminierung des Erregers sorgen. Die hohe Ähnlichkeit der Streptokokken-Antigene mit den humanen Keratinen 16 bzw. 17 könnte sekundär der Grund für eine mögliche kreuzreaktive Aktivierung, sogenanntem molekularem Mimikry von spezifischen T-Zellen und damit ein möglicher Auslöser der Psoriasis sein (Valdimarsson et al. (2009), Cai et al. (2012)). Eine Tonsillektomie verringert häufig den Schweregrad der Psoriasis (Thorleifsdottir et al. (2012)). Das Vorliegen von weiteren auslösenden Auto-Antigenen wird vermutet, gilt es aber zu beweisen. Das psoriatische autoimmune Entzündungsgeschehen der Haut ist ein komplexes Zusammenspiel, das durch die oben genannten Faktoren der Genetik sowie Umweltfaktoren beeinflusst wird (Lowe et al. (2014)). Ausgelöst wird die Erkrankung in der akuten frühen Phase meist durch einen äußeren Reiz, wie eine kleine Verletzung, einem Trauma (Köbner-Effekt), einer Infektion oder Medikamente. Der dadurch eintretende Zelltod führt letztendlich zur Aktivierung von Keratinozyten, die daraufhin das antimikrobielle Peptid AMP LL-37 freisetzen. Dieses Peptid bindet an DNA-/RNA-Fragmente zerstörter Hautzellen. (Lande et al. (2007), Ganguly et al. (2009)). Plasmazytoide dendritische Zellen, die normalerweise in gesunder Haut nicht zu finden sind, finden sich in auffällig hoher Zahl in psoriatischer Haut. Der DNA-/LL37-Komplex bindet an den intrazellulär gelegenen Toll-Like-Rezeptor (TLR)9 der plasmazytoiden dendritischen Zellen. Sie schütten Typ I IFN aus und spielen damit eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Erkrankung (Nestle et al. (2005)). Typ I IFN und weitere proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF, die durch die aktivierten Keratinozyten gebildet werden, aktivieren wiederum myeloide dermale dendritische Zellen, die ebenfalls in auffällig hoher Zahl in psoriatischer Haut zu finden sind (Zaba et al. (2009)). TNF $\alpha$  wiederum führt zur verstärkten Synthese von IL-1, IL-6 und IL-8 und aktiviert nukleäre Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B (*nuclear*

*factor of kappa light chain gene enhancer in B cells*). Wie eine Reihe von Studien belegen (Goldminz et al. (2013), Moorchung et al. (2013)), konnte der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B als wichtige Komponente bei der Pathogenese der *Psoriasis vulgaris* ausgemacht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von NF $\kappa$ B in der Epidermis und den hyperplastischen Basalzellen mit dem Entzündungsgeschehen der Haut korreliert. Auch das vermehrte Einwandern von Leukozyten konnte auf die erhöhte NF $\kappa$ B-Aktivität zurückgeführt werden (Moorchung et al. (2013)).

Aufgabe der aktivierten myeloiden dendritischen Zellen ist die Präsentation eines spezifischen Antigens an die T-Zellen. Mehrere Studien konnten belegen, dass die Anwesenheit eines gemeinsamen Antigens die Krankheit auslösen könnte (Chang et al. (1994), Menssen et al. (1995), Prinz et al. (1999), Vollmer et al. (2001)). Bei unterschiedlichen Patienten konnten oligoklonale T-Zellen, sowie klonale T-Zellrezeptor-Regionen in psoriatischen Läsionen gefunden werden. Auch die Anwesenheit des gleichen T-Zellklons im Laufe der Erkrankung deutet auf ein gemeinsames auslösendes Antigen hin. Dieses Antigen könnte der oben erwähnte DNA- bzw. RNA-/LL-37-Komplex sein.

In der späten bzw. chronischen Phase der Psoriasis ist die IL-23-/IL-17-Achse von entscheidender Bedeutung. Dendritische Zellen der Haut, die in der frühen Phase bereits aktiviert wurden, stimulieren und aktivieren über Botenstoffe, wie TNF $\alpha$ , IL-23 und IL-17 wiederum Subgruppen von T-Zellen, wie Th1- und Th17-Zellen, die sich bei einer psoriatischen Läsion vor allem in der Dermis finden (Loves et al. (2007)). In der Epidermis kommt es zu einer Ansammlung zytotoxischer T-Zellen (Loves et al. (2007)), wobei größtenteils die T-Helferzellen die Erkrankung induzieren und unterhalten (Gudjonsson et al. (2004)). Diese sind normalerweise bei der Infektabwehr des Körpers für die Erkennung von Antigenen zuständig, die ihnen von den antigenpräsentierenden Zellen (Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen) präsentiert werden. Ein Hinweis für das Vorliegen der CD4- und CD8-Zellen gibt das Köbner-Phänomen. Durch Setzung eines Reizes auf der Haut kommt es zur Auslösung der Psoriasis. In dieser Läsion finden sich zuerst CD4-Zellen und danach CD8-Zellen (Valdimarsson et al. (1986)). Ebenfalls ist der CD4-/CD8-Quotient erhöht (Baker et al. (1988), Camargo et al. (2013)). Bei Mäusen konnte eine psoriasisähnliche Hautentzündung induziert werden durch die Gabe von IL-23 (Zheng et al. (2006)). Die Th1- und Th17-Zellen produzieren IFN $\gamma$ , aber auch IL-17, IL-21 und IL-22 (Monteleone et al.

(2011)). Diese Vielzahl an Zytokinen führen zu einer Entzündung in der Haut, die sich selbst verstärkt und immer weiter Entzündungszellen anlockt und damit zum typischen Bild der Psoriasis mit Hyperkeratose, verstärkter Vaskularisierung und gestörter epidermaler Differenzierung führt (Dirschka et al. (2011)). Die vermehrte Bildung der Keratine 6 und 16 (Krueger (2005)) locken vermehrt neutrophile Granulozyten an und lassen die typischen Monroe'schen Mikroabzesse entstehen.

Verschiedene Studien belegen, dass zum weiteren Verständnis der molekularen Pathogenese der Psoriasis der JAK-/STAT-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt (van der Fits et al. (2004), Eriksen et al. (2005), Rácz et al. (2011)). In diesem Signalweg ist der Transkriptionsfaktor STAT1 neben STAT3 von entscheidender Bedeutung. Durch die Aktivierung von STAT1 kommt es zur Ausschüttung von IL-12, das wiederum die Produktion weiterer Zytokine auslöst, die die Entzündung unterhalten. Die Transkriptionsrate immunrelevanter Gene wird erhöht und die Polarisierung der naiven T-Zelle zur Th1-Zelle wird induziert. Diese produziert dann in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktor STAT4 wichtige Moleküle wie  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  (Cesare et al. (2009)).

Dieser Reaktionsablauf verursacht in der Haut eine Entzündung mit der Ausbildung der oben beschriebenen typischen Entzündungszeichen, vaskuläre Hyperplasie, sowie die Bindung von T-Zellen an Keratinozyten (Lowe et al. (2007)).

Einen weiteren wichtigen Anteil an der Pathogenese der *Psoriasis vulgaris*, scheinen Th17-Lymphozyten zu haben. Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 wird der IL-23-Rezeptor verstärkt exprimiert, so dass es zu einer Polarisierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen kommt. Th17-Zellen schütten ihrerseits das Zytokin IL-17 aus (Aggarwal et al. (2002), Cesare et al. (2009)), welche die Ausschüttung des Chemokins IL-8 zur Folge haben. IL-8 führt zur Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Haut, die sich histologisch als die schon genannten Munro-Mikroabzesse zeigen.

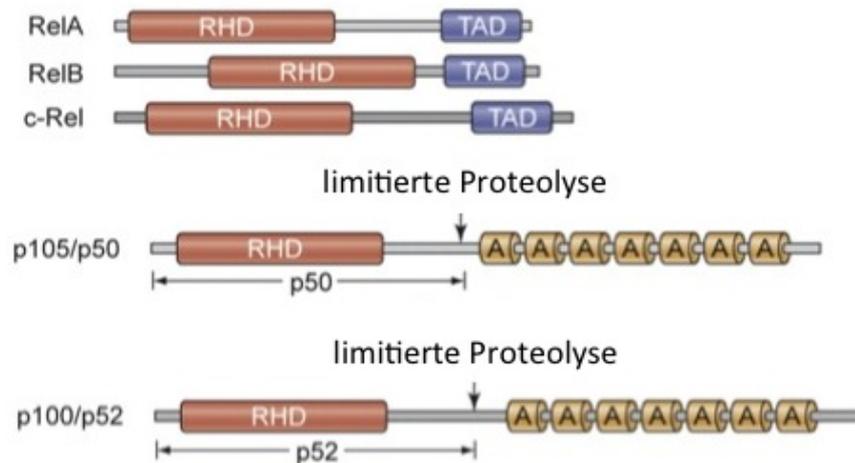
## 1.9 Der Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$

Sen und Baltimore, fanden 1986 heraus, dass sich der Transkriptionsfaktor im Zellkern reifer B-Lymphozyten befindet und dort an ein spezifisches Motiv im Enhancer des Gens für die  $\kappa$ -Kette der Immunglobuline bindet (Baeuerle (1991), Baltimore (2009)).

Es zeigte sich relativ schnell, dass NF $\kappa$ B in fast jedem Zelltyp exprimiert wird und dort als zentraler Koordinator der menschlichen Immunantwort fungiert (Pahl (1997, 1999), Lawrence et al. (2001)).

Mittlerweile konnten mehr als 500 verschiedenen Gene (Zytokine, Adhäsionsmoleküle) beschrieben werden, deren Expression durch NF $\kappa$ B reguliert wird (Faustman (2010)). Vor allem bei Infektionen und entzündlichen Vorgängen im Körper spielt er eine entscheidene Rolle im Ablauf der angeborenen Immunantwort. Am Strukturaufbau sind fünf bzw. sieben Proteine beteiligt, die eine gemeinsame, aus 300 Aminosäuren bestehende Domäne besitzen - die sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD). Über diese Domäne lassen sich jeweils zwei dieser Proteine kombinieren (Heterodimere) oder es kann alternativ zu Homodimer-Bildung kommen. Außerdem spielt sie eine wichtige Rolle für die Bindung an die DNA sowie für die Kerntranslokation. Zu den Proteinen der NF $\kappa$ B-Familie zählt man: NF $\kappa$ B 1 (p50 bzw. p105), NF $\kappa$ B 2 (p52 bzw. p100), RelA (p65), Rel B und c-Rel (Wulczyn et al. (1996), Baldwin (1996), Hayden (2004)). Die Rel-Proteine werden als reife Proteine direkt gebildet, während die nicht-Rel-Proteine p50 und p52 mittels limitierter Proteolyse aus ihren Vorläufern p105 und p100 entstehen. Sie enthalten im Gegensatz zu den Rel-Proteinen keine Transaktivierungsdomäne (TAD), allerdings eine wiederholte Abfolge von Ankyrin-Wiederholungen (A) neben der Rel-Homologie-Domäne (Fan (1991), Palombella et al. (1994), Betts (1996)). Im Gegensatz dazu zeigen die Rel-Proteine neben der Rel-Homologie-Domäne mindestens eine Transaktivierungsdomäne (Abbildung 1.3).

Alle NF $\kappa$ B-Proteine können Homo- bzw. Heterodimere untereinander ausbilden, nur Rel B kann lediglich mit p50 oder p52 dimerisieren. Sehr häufig kommt es zu einer Heterodimer-Bildung bestehend aus einem nicht-Rel-Protein und einem Rel-Protein (Chen et al. (1998)). Diese Heterodimere fördern aufgrund der Transaktivierungsdomäne die Transkription NF $\kappa$ B-abhängiger Gene. Dimere, die sich aus nicht-Rel-Proteinen zusammensetzen, hemmen durch Fehlen der Transaktivierungsdomäne eher die Transkription (Schmitz (1991)). Die Aktivität der NF $\kappa$ B-Dimere steht unter der Kontrolle von Proteinen der I $\kappa$ B-Familie, die diese Transkriptionsfaktoren über eine Interaktion hemmen können. Diese Familie umfasst, die im Zytosol befindlichen Vertreter I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$ , sowie die nukleären Mitglieder I $\kappa$ B $\gamma$  und Bcl-3 (Haskill et al. (1991), Wulczyn et al. (1992), Thompson et al. (1995), Whiteside

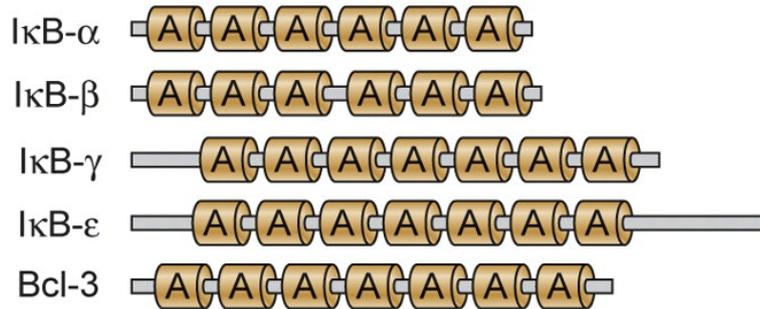


**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der NFκB-Proteine (Jost (2006)) In der Abbildung sind die nicht-Rel-Proteine p50/p105 und p52/p100, sowie die Rel-Proteine RelA (p65), RelB und c-Rel dargestellt. Beide Klassen haben eine DNA-Bindungsdomäne, die auch als Rel-Homologie-Domäne (RHD) bezeichnet wird und für die DNA-Bindung, sowie die Dimer-Bildung wichtig ist. Die Rel-Proteine besitzen eine Transaktivierungsdomäne (TAD) (Jost (2006)). Die nicht-Rel-Proteine bestehen darüber hinaus aus einer Abfolge von Ankyrin-Wiederholungen (A), die über eine Protease abgespalten werden können, wobei die Proteine p50 und p52 entstehen.

(1997), Kitamura et al. (2000)). Die Mitglieder der IκB-Familie, enthalten, wie die nicht-Rel-Proteine eine Abfolge von Ankyrin-Wiederholungen und zeigen damit einen ähnlichen Aufbau wie die nicht-Rel Proteine (Abbildung 1.4).

### 1.9.1 NFκB-Zelluläre Signalwege und Regulation

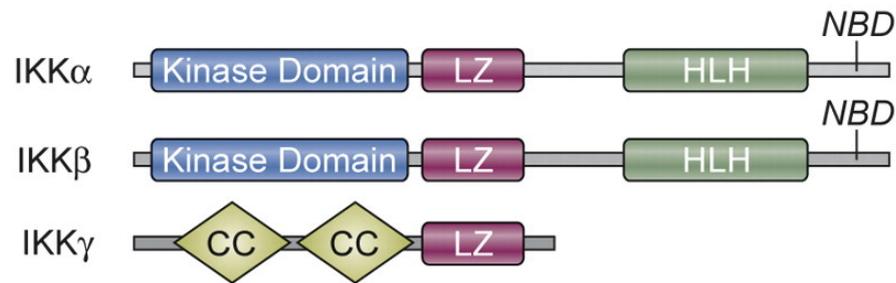
Durch eine Vielzahl von Stimuli kann der NFκB-Signalweg innerhalb der Zelle aktiviert werden. Dazu gehören nicht nur Pathogene, wie Viren, Bakterien und Parasiten, sondern auch biochemische Reize und zelluläre Botenstoffe, wie die pro-inflammatorischen Zytokine TNFα und IL-1, Hormone und Wachstumsfaktoren, sowie physikalischer und chemischer Stress (Ahn (2005), Sethi et al. (2008)). In B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Monozyten findet man NFκB konstitutiv im Zellkern, was nahe legt, dass der Transkriptionsfaktor in diesen Zellen auch ohne die äußere Ein-



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der Proteine der I $\kappa$ B-Familie (Jost (2006))  
 Der Aufbau der I $\kappa$ B-Proteine ist gekennzeichnet durch eine sechs- bzw. siebenfache Abfolge von Ankyrin-Wiederholungen (A), über die die Wechselwirkungen zwischen Proteinen vermittelt wird. Über dieses Motiv kann eine Verbindung mit NF $\kappa$ B hergestellt werden. Zudem spielt es eine Rolle bei der Inaktivierung von NF $\kappa$ B im Zytoplasma.

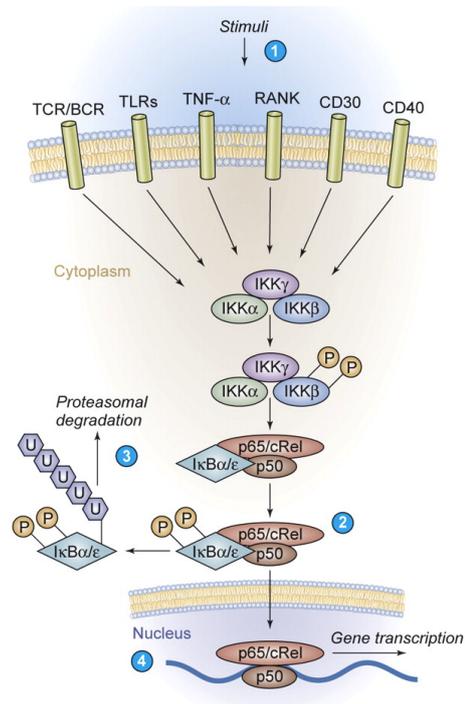
wirkung von Stimuli aktiv ist (Sen (1986), Baldwin (1996)). In der Regel liegt der Transkriptionsfaktor jedoch inaktiv im Zytoplasma vor und kann erst durch Aktivierung von außen in den Zellkern transloziert werden. Je nach Art der Aktivierung können verschiedene Signalwege vorgeschaltet sein. Zu den Wichtigsten zählen der Mitogen-Activated-Protein-Kinase-Weg (MAPK-Weg), der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-/Akt-Weg (PI3K/Akt) und der NF $\kappa$ B-Inducing-Kinase (NIK)-Signalweg. Der I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) wird durch die oben genannten Wege aktiviert und besteht aus folgenden Bestandteilen: die Ser-/Thr-Kinasen I $\kappa$ B-Kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ), den Katalysator I $\kappa$ B-Kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ) und den Regulator I $\kappa$ B-Kinase  $\gamma$  (IKK $\gamma$ ) (Scheidereit (2006)) (Abbildung 1.5). Nach Aktivierung leitet der Komplex den kanonischen Modus der NF $\kappa$ B-Aktivierung ein (Abbildung 1.6).

Im Ruhezustand liegt das NF $\kappa$ B an die inhibitorische Untereinheit I $\kappa$ B $\alpha$ , gebunden im Zytoplasma vor, wodurch NF $\kappa$ B in einem inaktiven Zustand ist und daran gehindert wird in den Zellkern zu gelangen (Baldwin (1996), Ghosh et al. (1998)). Oben genannte Stimuli führen dazu, dass das an NF $\kappa$ B gebundene I $\kappa$ B $\alpha$  an Ser32 und Ser36 und das I $\kappa$ B $\beta$  an Ser19 und Ser23 phosphoryliert (Brockman et al. (1995), Brown et al. (1995)), im Anschluss polyubiquitinyliert und nachgeschaltet durch das 26S-Proteasom degradiert wird (Beg et al. (1993), Courtois (2000)). Das führt zur Freisetzung der NF $\kappa$ B-Proteine und der Demaskierung ihres nukleären Lokalisationssignals.



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung der  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase-Komplexe (IKK) (Jost (2006)) Der IKK-Komplex enthält die IKK $\alpha$ - und IKK $\beta$ -Untereinheit, deren Aufbau durch die katalytische Kinase-Domäne charakterisiert ist. Zudem enthalten sie einen Leucin-Zipper (LZ) und eine helix-loop-helix Region (HLH), die sowohl für die Homodimerisation wie für die Heterodimerisation verantwortlich sind. Die NEMO-bindende Domäne (NBD) der katalytischen Untereinheit interagiert mit IKK $\gamma$ , das ebenfalls zum IKK-Komplex gehört und deren Aufbau durch eine Coiled-Coil-Domäne (CC) und einen Leucin-Zipper (LZ) charakterisiert ist.

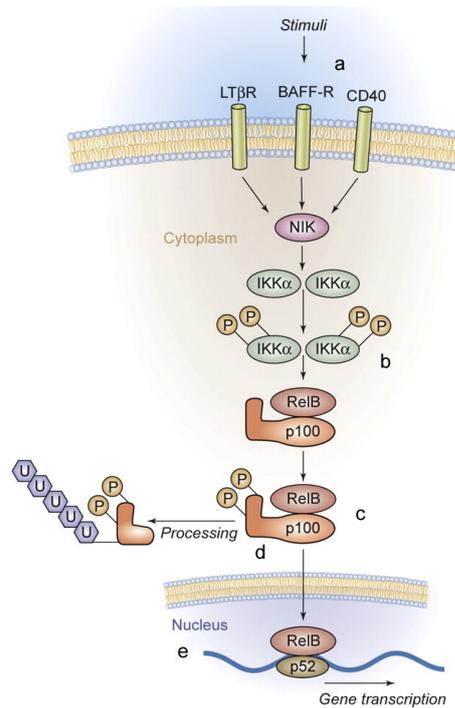
Damit kann das  $\text{NF}\kappa\text{B}$  in den Zellkern transloziert werden (Pahl (1999)) und dort an spezifische DNA-Motive binden, wodurch die Transkription von Zytokinen, wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 induziert wird. Im Gegensatz dazu steht der alternative Modus der  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung, der bislang hauptsächlich in B-Zellen beschrieben werden konnte. Hier kommt es zur Aktivierung des IKK, der direkt den  $\text{NF}\kappa\text{B}2$ -/p100-Komplex phosphoryliert. Weiterhin kommt es zur proteolytischen Abspaltung des Ankyrin-Restes, wodurch das Protein p52 entsteht. Dieses dimerisiert direkt mit Rel B (Abbildung 1.7). Die  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Expression wird zudem autoregulatorisch über einen positiven wie auch einen negativen Feedback-Mechanismus gesteuert. Viele durch  $\text{NF}\kappa\text{B}$  stimulierte Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$  aktivieren die erneute Freisetzung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  und führen zu einer Verstärkung der biologischen Antwort. Eine Inhibition kann durch das  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein erzielt werden, welches bei Neusynthese im Zellkern direkt an  $\text{NF}\kappa\text{B}$  binden kann und damit dessen Transkription unterbindet (Sun et al. (1993)).



**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung des kanonischen NFκB-Signalweges (Jost (2006)) Ein extrazellulärer Stimulus aktiviert spezifische Rezeptoren (1) und setzt damit den im Zytoplasma ablaufenden kanonischen Signalweg in Gang. Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert IKKβ und induziert damit die Polyubiquitinierung des IKK-Komplexes (2), was zum Abbau eben dieses Komplexes führt (3). Das entstandene NFκB-Dimer transloziert in den Zellkern und führt zur Aktivierung der Genexpression (4).

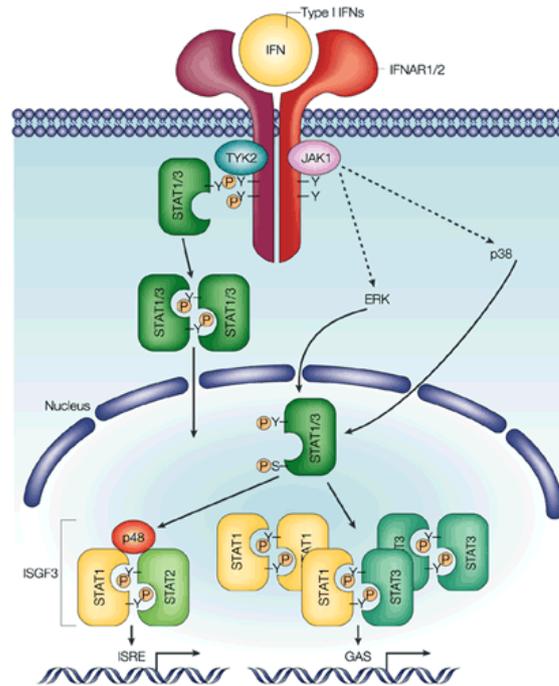
## 1.10 Der Transkriptionsfaktor STAT1

STAT1 ist eines von sieben bekannten STAT-Proteinen beim Menschen. Diese Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und der Steuerung der Immunantwort beteiligt. IFN $\gamma$ -Signale aktivieren über spezifische membranständige Rezeptoren rezeptor-assoziierte intrazelluläre Janus-Kinasen (JAK), die wiederum spezifische Tyrosinreste des Rezeptors phosphorylieren können. Die STAT1-Monomere können daraufhin an ihrer SH2-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinkinase-Rezeptor binden und werden ebenfalls durch die Janus-Kinasen phosphoryliert. Es kommt zur Dimerisierung zweier STAT-Moleküle. Das Dimer ist



**Abbildung 1.7:** Schematische Darstellung des alternativen NFκB-Signalweges (Jost (2006)). Ein extrazellulärer Stimulus führt zur Aktivierung spezifischer Rezeptoren und setzt damit den im Zytoplasma ablaufenden alternativen Signalweg in Gang (a). Die Aktivierung führt zur Phosphorylierung von IKKα (b), welches wiederum die Phosphorylierung des RelB-/p100-Komplexes katalysiert (c). Die gleichzeitig ablaufende Proteolyse läßt das p52-Protein entstehen (d), welches mit RelB dimerisiert und in den Zellkern transloziert (e).

in der Lage ein Kern-Lokalisationssignal (NLS) auszubilden, das die Translokation des Dimers in den Zellkern vermittelt. Es fungiert im Kern als Transkriptionsfaktor, der spezifisch die Genexpression initiiert (Abbildung 1.8). Über eine spezifische DNA-Bindungsdomäne erkennen die meisten Dimere ein etwa 8-10 Basenpaar langes DNA-Element und erhöhen so ihre Transkriptionsrate (Decker et al. (1991), Darnell (1997), Leonard (2001)).



Nature Reviews | Immunology

**Abbildung 1.8:** Schematische Darstellung des STAT1-Signalweges (Katze et al. (2002)).

IFN $\gamma$ -Signale aktivieren über spezifische membranständige Rezeptoren Rezeptor-assoziierte intrazelluläre Janus-Kinasen, die wiederum spezifische Tyrosinreste des Rezeptors phosphorylieren können. Die STAT1-Monomere können daraufhin an ihrer SH-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinkinase-Rezeptor binden und werden ebenfalls durch die Janus-Kinasen phosphoryliert. Es kommt zur Dimerisierung zweier STAT-Moleküle. Das Dimer wandert in den Zellkern und initiiert dort als Transkriptionsfaktor spezifisch die Genexpression.

## 1.11 Therapiemöglichkeiten

Die drei Säulen der Therapie der Psoriasis sind zum einen die Lokalthherapie, die Phototherapie und bei starkem Leidensdruck die systemische Therapie. Die dabei verwendeten Substanzen sind in Tabelle 1.2 aufgeführt.

Lokaltherapie	Salizylsäure Calcipotriol (Vitamin-D3-Analogon) Glukokortikoide (z.B. Betamethason) Dithranol Retinoide (z.B. Tazaroten)
Phototherapie	Ultraviolett-Phototherapie Psoralen (Wirkungsverstärker) + UVA/UVB
Systemische Therapie	Fumarsäure Retinoide klassische Immunsuppressiva (bsp. Cyclosporin A, Methotrexat) Biologika (bsp. Etanercept, Infliximab, Adalimumab)

**Tabelle 1.2:** Therapiemöglichkeiten der *Psoriasis vulgaris* (Moll (2010a))

### 1.11.1 Lokaltherapie

Die Lokaltherapie steht am Anfang jeder Behandlung. Um zu Beginn die Entzündung in der Haut zugänglich zu machen, müssen zuerst die Schuppen entfernt werden, ein Prozess, den man als Keratolyse bezeichnet. Dies wird mithilfe von Salizylsäure oder Harnstoff erreicht. In Kombination mit Ölbädern wird der Effekt der Keratolyse verstärkt. Die eingangs erwähnten Vitamin-D3-Analoga, die Glukokortikoide, Dithranol und die Retinoide wirken anti-entzündlich, sowie anti-proliferativ auf die Keratinozyten und wirken damit der Hyperproliferation der Epidermis entgegen.

### 1.11.2 Phototherapie

Bei schwereren Verläufen der Psoriasis wird unterstützend zur Lokaltherapie die Ultraviolett-Phototherapie angewandt. Zu Beginn behandelt man die Haut nur mit UVB-Strahlung. Weitere Behandlungsmaßnahmen können die Kombination aus UVA- und

UVB- Strahlung mit dem Wirkungsverstärker Psoralen sein, der die Eindringtiefe der Strahlung erhöht. Zudem vermindert Psoralen durch eine dabei eingehende Verbindung mit Bestandteilen der Hautzellen die Zellteilungsgeschwindigkeit und wirkt damit immunmodulierend.

### 1.11.3 Systemische Therapie

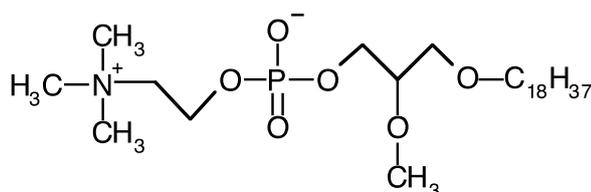
Als letzter Schritt zur Behandlung der Psoriasis zählt die systemische Therapie. Die systemisch applizierten Medikamente zeigen ebenfalls einen anti-entzündlichen Effekt durch Inhibition von Rezeptoren, wie dem  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptor oder Signalmolekülen, wie der Phosphatase Calcineurin, die durch Cyclosporin A gehemmt wird.

Welche Therapie ein Patient erhält, sollte immer individuell entschieden werden in Abhängigkeit der Schwere der Erkrankung, zusätzlichen Begleiterkrankungen, Erfahrungen vorheriger Therapien, sowie Auswirkungen auf die Lebensqualität und die damit verbundene Adhärenz des Patienten. Das Ziel sollte immer die Reduktion des PASI-Scores um mindestens 75% des Ausgangswertes innerhalb von 10-16 Wochen sein. Damit zeigt sich bei dem Großteil der Patienten auch eine Verbesserung der Lebensqualität (Nast et al. (2017)).

## 1.12 Das Konzept der Etherlipide

Eine neuere Therapieoption stellen die synthetischen Phospholipide dar, die bisher nur Anwendung in der Tumorthherapie fanden. In den 1960er Jahren untersuchten Herbert Fischer und Paul Gerhard am Max-Planck-Institut für Immunologie in Freiburg die Wirkung des 2-Lysophosphatidylcholin (2-LPC). Dabei konnten sie beobachten, dass diese Substanz die Phagozytoseaktivität von Makrophagen anregt (Burdzy et al. (1964)). Darüber hinaus akkumulierte die hydrophobe Substanz in der Zellmembran und bildete Läsionen, was zur Lyse der Zelle führte. Strukturell besteht das 2-LPC aus einem Glycerol-Grundgerüst, das an der Position sn1 des Glycerins über eine Phosphatgruppe mit dem Alkohol Cholin verestert ist. An der sn2-Position findet sich eine Hydroxygruppe und an der sn3-Position ist Glycerol mit einer Fettsäure verestert. Aufgrund des amphiphilen Charakters wirkt es als starkes Detergenz und destabilisiert so die Membran (Berg et al. (2013)). In der Membran befindliche

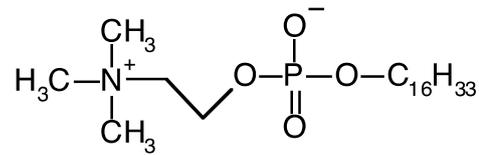
Acyltransferasen führen durch das Transferieren eines Fettsäurerestes auf das zweite C-Atom des Glycerol-Grundgerüsts zu einem schnellen Umbau bzw. zu einer schnelleren Verstoffwechslung, wodurch das 2-LPC eine kurze Halbwertszeit besitzt (Erbar (1995)). Daraus ergab sich, dass die Verbindung chemisch modifiziert werden muss, um den schnellen Abbau zu verzögern, damit derartige Analoga dann gezielt in wirksamen Konzentrationen gegen Tumorzellen eingesetzt werden können (Munder et al. (1966), Munder (1973), Herrmann (1985)). Um dieses Konzept zu verfolgen, wurde zuerst die Fettsäure an Position sn3 des Glycerols durch einen langkettigen Alkohol ersetzt, wodurch ein Ether entstand (van Blitterswijk et al. (1987)). In weiteren Ansätzen wurde die Position sn2 des Glycerols durch Anlagerung einer Methylgruppe vor Reacylierung geschützt. Als Prototyp dieser synthetisch hergestellten Antitumorlipide bzw. Alkyletherlipide gilt das Edelfosin® (Abbildung 1.9).



**Abbildung 1.9:** Strukturformel von Edelfosin® (ET-18-OCH3)

Weitere Modifikationen in der Struktur, wie das Entfernen des Glycerolmoleküls und die direkte Kopplung von Alkylkette und Phosphocholinrest führten 1990 zur Entstehung der Alkylphosphocholine, bei denen Miltefosin® (Abbildung 1.10) und Perifosin® die wichtigsten Vertreter sind (Eibl (1990), Hilgard et al. (1997)). Chemische Veränderungen an der ursprünglichen Substanz führten zu einer Erhöhung der Halbwertszeit von weniger als 1h für LPC auf etwa 70h für Alkylphosphocholine, was die Grundlage für den möglichen therapeutischen Einsatz in der Tumorthherapie bildete (Unger (2001)).

Studien belegen, dass all diese Substanzen im Gegensatz zu konventionellen Zytostatika nicht die DNA schädigen (Berdel (1991), Lohmeyer (1995)), sondern in die Zellmembran interkalieren (Eibl (1990)) und akkumulieren, was zur Veränderung in der Membranfluidität und zur Störung von Signalkaskaden führen kann (Jiménez-López et al. (2002), Berkovic et al. (2002)). Dies wiederum beeinflusst die Bildung und die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Gajate (2002), Mollinedo et al. (2004)). So

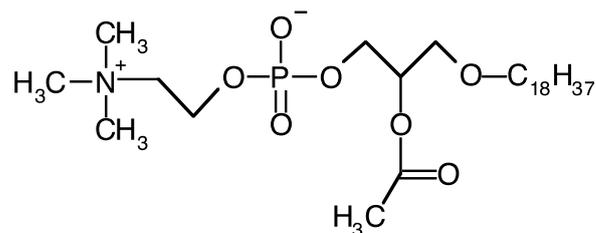


**Abbildung 1.10:** Strukturformel von Miltefosin® (Hexadecylphosphocholin)

aktiviert Edelfosin® die Jun-terminale Kinase (JNK) bei gleichzeitiger Inhibition des MAP-Kinase- und des PI3K-/Akt-Weges, was zum Zelltod maligner Tumorzellen führt (Zhou et al. (1996), Gajate et al. (1998), Ruiter et al. (1999, 2001, 2003), Samadder et al. (2004)).

### 1.12.1 Das glykosidierte Phospholipid Inositol-C2-PAF

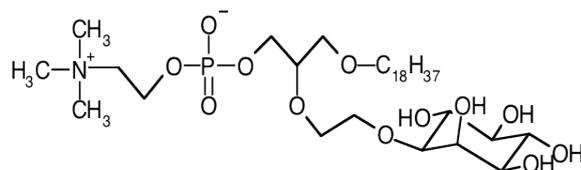
Der plättchenaktivierende Faktor ist ein natürlich vorkommendes Phospholipid, das strukturell mit den Antitumorlipiden verwandt ist (Danker et al. (2010)). Es trägt seinen Namen, da es die Fähigkeit besitzt eine Thrombozytenaggregation hervorzurufen und spielt eine grosse Rolle im Gefäßsystem und innerhalb des Zusammenspiels von Blutbestandteilen. Chemisch gesehen ist PAF ein 1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glycero-3-phosphatcholin und trägt an der Position sn1 eine veretherte Kohlenwasserstoff-Kette mit 18 oder 16 Kohlenstoffatom und an der Position sn3 eine Phosphocholingruppe (Abbildung 1.11).



**Abbildung 1.11:** Strukturformel des plättchenaktivierenden Faktors PAF (1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glycero-3-phosphatcholin)

Glykosidierte Phospholipide sind eine neuartige Untergruppe der synthetischen Etherlipide (Semini et al. (2014b)). Inositol-C2-PAF stellt als PAF-Derivat dabei das effektivste Mitglied dieser Gruppe dar und zeichnet sich durch seinen amphiphilen Charakter aus. Das Inositol-C2-PAF hat an der Position sn1 eine Phosphocholingruppe.

Die sn2-Position ist über eine C2-Gruppe mit dem 6-wertigen Polyalkohol Inositol verknüpft und an Position sn3 ist eine Alkylkette aus 18 Kohlenstoffatomen verethert, die ein leichteres Eindringen in die Zelle ermöglicht (Fischer et al. (2006)). Die Modifizierung des PAF mit Inositol an der Position sn2 macht das Molekül insgesamt hydrophiler (Abbildung 1.12).



**Abbildung 1.12:** Strukturformel von Inositol-C2-PAF

Die Wirkungsmechanismen von Inositol-C2-PAF wurden vor allem in der humanen immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie HaCaT untersucht. Es zeigte unter allen getesteten Mitgliedern die höchste Effizienz und die niedrigste Zytotoxizität. Zudem hat es einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel, die Zelldifferenzierung und -entwicklung. Darüber hinaus reguliert Inositol-C2-PAF eine große Anzahl von Genen herunter, deren Produkte an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt sind (Semini et al. (2011a, 2014a)). Diese anti-inflammatorische Wirkung konnte auch *in vivo* an Mausmodellen für die Psoriasis gezeigt werden (Forkel et al. (2014)) und könnte somit eine Option zur Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der *Psoriasis vulgaris* darstellen.

### 1.13 Zielsetzung der Arbeit

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das synthetische Etherlipid Inositol-C2-PAF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an geeigneten Tiermodellen einen anti-entzündlichen Einfluss auf die Entzündungsreaktion bei der Psoriasis besitzt. In dieser Arbeit geht es darum, den Einfluss des Etherlipids Inositol-C2-PAF auf Psoriasis-relevante Signalwege in immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) zu untersuchen. Der Fokus soll hierbei auf dem Einfluss auf den Transkriptionsfaktoren NFκB und STAT1 liegen. Auf Proteinebene soll analysiert werden, wie sich durch An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF die Expression aber auch die Lokalisation von NFκB und STAT1 in Zellen

---

verändert. Dieses soll durch die Bestimmung der relativen Proteinmenge des Transkriptionsfaktors mittels Western Blot-Analyse, sowie mittels Kern-Zytosol-Trennung und nachgeschalteter Western Blot-Analyse der Fraktionen in Zytokin-stimulierten Zellen überprüft werden. Darüber hinaus soll ein möglicher Einfluss des Lipids auf die Expression und Phosphorylierung von  $I\kappa B\alpha$ , einem wichtigen NF $\kappa$ B-Regulatorprotein auf proteinbiochemischer Ebene gezeigt werden.



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Laborchemikalien kommen von der Firma Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Applichem (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) und wurden in höchster Qualität bezogen. Inositol-C2-PAF wurde im Labor von Vadim Shmanai (Minsk, Weißrussland) synthetisiert.

#### 2.1.2 Farbstoffe

Ponceaurot S 10x	Roth, Karlsruhe
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim

**Tabelle 2.1:** Farbstoffe

#### 2.1.3 Sonstige Lösungen und Reagenzien

Bovine Gamma Globulin Standard, 2mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Protein Assay-Bradford Stammlösung	Biorad, München
Fetales Kälberserum	Pan Biotech, Aidenbach
<i>Fortsetzung auf nächster Seite...</i>	

**Tabelle 2.2:** Sonstige Lösungen und Reagenzien

Penicillin/Streptomycin	Pan Biotech, Aidenbach
L-Glutamin	Pan Biotech, Aidenbach
10x Trypsin	Biowest, Seevetal
Lösung A für Acrylamidgel	58,4g! Acrylamid 1,6g N,N Methylenbisacrylamid ad 200ml <i>aqua dest.</i>
Lösung B für Acrylamidgel	0,8g SDS 36,3g Tris-HCl pH 8,8 ad 200ml <i>aqua dest.</i>
Lösung C für Acrylamidgel	0,4g SDS 6,0g Tris-HCl pH 6,8 ad 100ml <i>aqua dest.</i>
APS 10%	Roth, Karlsruhe
Temed	Roth, Karlsruhe
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Super Signal West Femto	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Immersionsöl	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorescin	Fluka, Steinheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
Mount Media (Eindeckmittel)	Roth, Karlsruhe

**Tabelle 2.2:** Sonstige Lösungen und Reagenzien - Fortsetzung

#### 2.1.4 Geräte

Brutschrank Heraeus Instruments	ThermoElectron, Langenselbold
Zellkulturbank Airstream	ESCO Micro Pte.Ltd., Singapur
<i>Fortsetzung auf nächster Seite...</i>	

**Tabelle 2.3:** Geräte

Heizblock Eppendorf Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Photometer Biophotometer UV	Eppendorf, Hamburg
Immunfluoreszenzmikroskop Axiovert 200 Fluorescence	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda Königshofen
Rüttelblock Model 3013	GFL, Burgwedel
Magnetrührer Typ RH B2	Ika Werke, Staufen
pH-Meter Model 646 digital	Knick, Berlin
Kühlzentrifuge Heraeus Biofuge Fresco	ThermoElectron, Langenselbond
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Vortex Mixer Genie® 2	Scientific Industries, USA
Feinwaage Adventurer (d=0,0001g)	Ohaus Corp., USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Wippe	GFL, Burgwedel
Elektrophorese-System	BioRad, München
Western Blot-System	BioRad, München
Immunfluoreszenz-System	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Imager Versadoc 4000TM MP	BioRad, München
Zentrifuge Megafuge 1.0 Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Tabelle 2.3: Geräte - Fortsetzung

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflasche 75ml	BD Falcon, USA
Glaspipetten mit/ohne Watte	Roth, Karlsruhe
<i>Fortsetzung auf nächster Seite...</i>	

Tabelle 2.4: Verbrauchsmaterialien

Falcontube 15ml/50ml	BD Falcon, USA Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
6cm-Schalen	BD Falcon, USA
Cryovial	Nunc Cryotube Vials, Dänemark
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Dassel
Blotfilter	Whatman, Dassel
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Immunfluoreszenz-System	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Spritzen	BD Falcon, USA
Kanülen	Braun, Melsungen

**Tabelle 2.4:** Verbrauchsmaterialien - Fortsetzung

### 2.1.6 Zellkulturmedien

RPMI 1640 ohne L-Glutamin (500ml)	Lonza BioWhittaker, USA
RPMI 1640 (440ml) (Komplett) + 10ml L-Glutamin + 10ml P/S + 50ml fetales Kälberserum	Lonza BioWhittaker, USA
<i>Keratinocyte-Serum Free Medium</i> + L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>Defined Keratinocyte-SFM Growth Supplement</i>	Zusatz für das Keratinocyte-SFM

**Tabelle 2.5:** Zellkulturmedien

## 2.1.7 Puffer

Alle verwendeten Puffer werden bei Bedarf mit aqua dest. verdünnt und bei 121°C für 20min bei 1bar autoklaviert.

PBS/1-fach	PanBiotech, Aidenbach
PBS/EDTA	500ml PBS + 250ml EDTA
TBS/10-fach	87,7g 150mM NaCl 12,1g 7,7mM Tris-HCl pH 7,5 ad 1000ml <i>aqua dest.</i>
5-fach reduzierter Probenpuffer	250mM Tris, 25% Glycerin 7,5% SDS 0,25mg/ml Bromphenolblau 12,5% b-Mercaptoethanol
Elektrophorese-Laufpuffer/10-fach	30,3g 25mM Tris, pH 8,8 144,2g 192mM Glycin 10g 0,1% SDS ad 1000ml <i>aqua dest.</i>
Blockpuffer	PBS/0,1% Tween + 5% Magermilch TBS/0,1% Tween + 5% Magermilch 5% BSA/TBS/0,1% Tween 1% BSA/TBS/0,1% Tween
Waschpuffer	PBS/0,1% Tween TBS/0,1% Tween
Solubilisationspuffer	50mM Hepes 150mM NaCl 1% Triton X 100 1mM MgCl <sub>2</sub> 1mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,5 (Na(OH))
<i>Fortsetzung auf nächster Seite...</i>	

Tabelle 2.6: Puffer

Western Blot-Transferpuffer/10-fach	30,25g 25mM Tris, pH 8,0-10,5 144g 192mM Glycin ad 1000ml <i>aqua dest.</i>
Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer	PFA/Saponin 0,0025%
Hypoosmolarer Puffer 1	2mM KCl 1,5mM MgCl <sub>2</sub> 10mM Hepes pH 7,2 mit 1M KOH
Hyperosmolarer Puffer 2	420mM NaCl 2mM KCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10% Glycerin 20mM Hepes pH 7,2 mit 1M KOH

Tabelle 2.6: Puffer - Fortsetzung

## 2.1.8 Acrylamidgele 7,5% für SDS-Page

Trenngel	2,25ml Lösung A 2,25ml Lösung B 4,5ml <i>aqua dest.</i> 45µl APS 10% 4,5µl Temed
<i>Fortsetzung auf nächster Seite...</i>	

Tabelle 2.7: Acrylamidgele 7,5% für SDS-Page

Sammelgel	0,4 ml Lösung A 0,75ml Lösung C 1,85ml <i>aqua dest.</i> 15µl APS 10% 5µl Temed
-----------	---

**Tabelle 2.7:** Acrylamidgele 7,5% für SDS-Page - Fortsetzung

## 2.1.9 Inhibitoren

### 2.1.9.1 Protease-Inhibitoren

PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase-Inhibitor-Cocktail	10x Sigma-Aldrich, Steinheim

**Tabelle 2.8:** Protease-Inhibitoren

### 2.1.9.2 Phosphatase-Inhibitoren

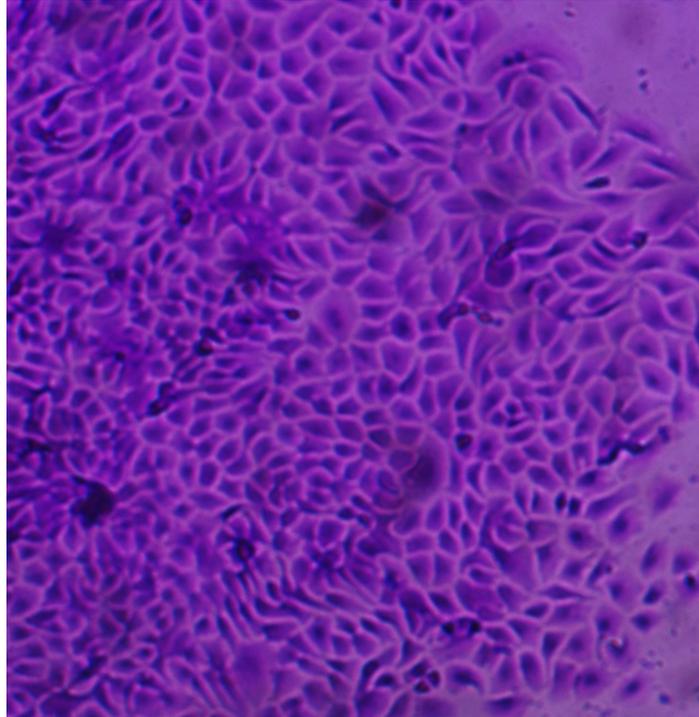
Natrium-Vanadat	AppliChem, Darmstadt
-----------------	----------------------

**Tabelle 2.9:** Phosphatase-Inhibitoren

### 2.1.10 Zell-Linie

HaCaT/CLS (*human adult low calcium high temperature keratinocytes/cell lines service*) ist eine immortalisierte, menschliche Keratinozyten-Zell-Linie, entnommen aus einem Hautabschnitt des Rückens einer 62-jährigen Patientin, die spontan transformiert (Schürer et al. (1993)). Die Zellen besitzen die Fähigkeit terminal zu differen-

zieren (Boukamp (1988)).



**Abbildung 2.1:** HaCaTs

### 2.1.11 Zytokine

Zytokin	Konzentration	Hersteller
IL-6	WB: 10ng/ml IF: 20ng/ml	Immuno Tools, Friesoythe
IFN $\gamma$	WB: 10ng/ml IF: 10ng/ml	Immuno Tools, Friesoythe

**Tabelle 2.10:** Zytokine

## 2.1.12 Antikörper

## 2.1.12.1 Primär-Antikörper für Western Blot-Analyse und Immunfluoreszenz-Analyse

Antikörper / Konzentration	Sekundär-Antikörper / Konzentration	Hersteller
NFκB p105/p50 WB 1:2000 IF 1:250	Rabbit 1:2500	Abcam, UK
IκBα WB 1:2000	Mouse 1:2000	Cell Signaling Technology®, Danvers
pIκBα WB 1:1000	Mouse 1:5000	Cell Signaling Technology®, Danvers
STAT1 WB 1:1000 IF 1:100	Rabbit 1:2500	Cell Signaling Technology®, Danvers
E-Cadherin WB 1:500	Mouse 1:5000	Invitrogen, Darmstadt
EGFR WB 1:1000	Mouse 1:5000	Invitrogen, Darmstadt
Vinculin WB 1:1000	Mouse 1:2000	Sigma Aldrich, Steinheim
P300 WB 1:1000	Mouse 1:2000	BD, USA

Tabelle 2.11: Primär-Antikörper

## 2.1.12.2 Sekundär-Antikörper

## Western Blot-Analyse

Goat Anti-Mouse IgG, POD	Jackson ImmunoResearch, UK
Goat Anti-Rabbit IgG, POD	Jackson ImmunoResearch, UK

**Tabelle 2.12:** Western Blot-Analyse

## Immunfluoreszenz-Analyse

Antikörper/Konzentration	Hersteller
Hoechst 33342 IF 1:3000	Sigma Aldrich, Steinheim
Phalloidin-Texas Red 2,5µl/100µl	Invitrogen, Darmstadt
Goat Anti-Rabbit Alexa Fluor® 488 IF 1:1000	Molecular Probes®, Darmstadt
Goat Anti-Mouse Alexa Fluor® 488 IF 1:1000	Molecular Probes®, Darmstadt

**Tabelle 2.13:** Immunfluoreszenz-Analyse

## 2.1.13 Proteinmarker

Precision Plus Protein™ Standards Dual Color	BioRad, München
---	-----------------

**Tabelle 2.14:** Proteinmarker

### 2.1.14 Software und Datenbanken

Axiovision 4.6	Zeiss, Jena
Quality One Beta 4.6.5	BioRad, München
Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
ImageJ 1.440	National Instituts of Health, USA
GraphPadPrism 6.01	GraphPad Software, Inc., USA

**Tabelle 2.15:** Software und Datenbanken

### 2.1.15 Statistik

Die Daten wurden als Balkendiagramme des Mittelwertes visualisiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Vergleiche zwischen den Gruppen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Tukeys Post-Hoc-Test. Vergleiche von zwischen den Gruppen über die Zeit bzw. zwischen den Gruppen und gleichzeitig zwischen nukleärer und zytosolischer Fraktion erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Sidak post-hoc Test. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als signifikant angesehen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Techniken

#### 2.2.1.1 Einfrieren von Zellen

Die Zellsuspension wird 3min bei 13000rpm zentrifugiert, um das überstehende RPMI-Medium gut absaugen zu können. Das Pellet wird mit 900µl inaktiviertem FCS und 100µl DMSO resuspendiert und in ein Cryovial überführt, langsam in einer mit Iso-propanol gefüllten Box auf -80°C heruntergeföhren und anschließend bei -80°C gelagert.

### 2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wird das Cryovial mit 37°C warmen RPMI-Komplettmedium versetzt und zusammen mit den aufgetauten nun suspendierten Zellen vorsichtig in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wird 3min bei 13000 rpm zentrifugiert und das überstehende Medium abgesaugt. Das Zell-Pellet wird erneut mittels Kanüle in 1ml RPMI-Komplettmedium resuspendiert und in eine 150ml Zellkulturflasche überführt. Die Flasche wird bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

### 2.2.1.3 Zellzählung und Aussaat

Für die Zellzählung werden die Zellen in der Zellkulturflasche zweimal mit PBS/EDTA gewaschen und danach mit 1:10 verdünnten Trypsin/PBS/EDTA behandelt. Die Zellkulturflasche wird im Brutschrank bei 37°C ca. 10min inkubiert. Der Zellrasen löst sich von der Plastikoberfläche ab. Die Zellsuspension wird in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 3min bei 13000rpm sedimentiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und das Zell-Pellet wird in 2ml RPMI (Komplett)-Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl werden 100µl einer 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnten Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Die Zellzahl der lebenden Zellen wird in 4 Quadranten à 16 Kleinstquadraten der Zählkammer bestimmt. Danach wird der Mittelwert der gezählten Zellzahlen gebildet. Berechnung zur Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer:

Bildung des Mittelwertes aller gezählten Quadranten

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \cdot 10^4 \cdot 10$$

$$\text{Zellzahl} \cdot 10^4(\text{Verdünnung}) = \text{Zellzahl} \cdot 10^5$$

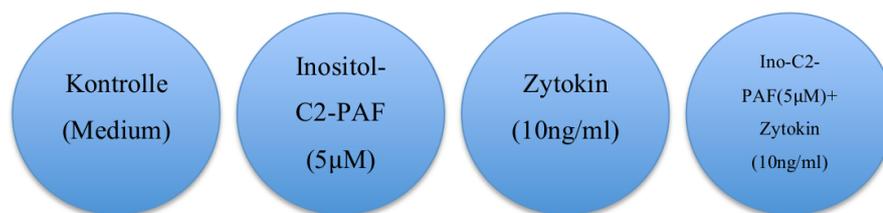
In die für den Versuch benötigten Schalen wird das RPMI-Komplettmedium vorgelegt und anschließend mit dem berechnetem Zellvolumen beimpft. Nach gleichmäßiger Verteilung der Zellen werden sie bei 37°C kultiviert, wobei sie alle zwei bis drei Tage mit frischem Medium versorgt werden.

#### 2.2.1.4 Vorbereitung für die Stimulation

Mit einer 60-70%-igen Konfluenz der Zellen werden sie wie beschrieben für den jeweiligen Versuch stimuliert. Hierbei wird das in den Schalen befindliche RPMI-Medium abgesaugt. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und dann mit serumfreiem Keratinozytenmedium mit Zusätzen (1. Stimulationsmedium) für 24h behandelt. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 24h mit Keratinozytenmedium (2. Stimulationsmedium) kultiviert.

#### 2.2.1.5 Stimulation

Bei der Stimulation werden die Zellen (mind.  $7,5 \cdot 10^5$ ) mit Inositol-C2-PAF und IL-6 in den Konzentrationen nach dem unten aufgeführten Schema (Abbildung 2.2) behandelt und bei 37°C aufbewahrt.



**Abbildung 2.2:** Prinzipieller Versuchsaufbau zur Behandlung der HaCaT-Zellen in den beschriebenen Experimenten

**Kurzzeitstimulation** Die Kurzzeitstimulation erfolgt für 15min, 30min und 60min mit vorheriger Vorinkubation für 1h mit Inositol-C2-PAF in der Konzentration 5µM. Die benötigten Zytokine werden zur Stimulation in den angegebenen Konzentrationen aus der Tabelle 2.10 eingesetzt.

**Langzeitstimulation** Bei der Langzeitstimulation werden die Zellen ohne Vorinkubation mit Inositol-C2-PAF über 24h bzw. 48h behandelt. Die Zytokine werden auch hier zur Stimulation in den angegebenen Konzentrationen aus der Tabelle 2.10 eingesetzt.

## 2.2.2 Zellgewinnung

### 2.2.2.1 Zellgewinnung mit Solubilisierung

Die Zellen werden nach den entsprechenden Inkubationszeiten abgeschabt und mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 100µl Solubilisationspuffer (+PMSF 1mM, Na-Vanadat 1mM, Na-Fluoreszin 5mM, PIC 1:100) versetzt und mechanisch von der Platte abgelöst. Die Zellen werden in ein Reaktionsgefäß überführt und durch mehrmaliges Aufziehen in einer möglichst dünnen Kanüle aufgeschlossen. Die Zellen werden 60min bei 4°C schüttelnd lysiert. Das Lysat wird 15min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält die zytosolischen Bestandteile inklusive intakter Zellkerne und kann für die Proteinbestimmung eingesetzt werden.

### 2.2.2.2 Zellgewinnung mit Kern-Zytosol-Trennung (Klaile (2006))

Bis zu  $3 \times 10^7$  Zellen (15cm-Schale) zweimal mit PBS waschen und mit 2ml PBS die Zellen von der Platte abschaben. Die Zellsuspension 2min bei 1800rpm zentrifugieren. Verglichen mit dem Zellpellet fünfmal mehr hypoosmolarem Puffer 1 (optional direkt vor dem Versuch frisch dazugeben: 1mM PMSF, 1mM Vanadat, 0,1mM Pervanadat, 1mM DTT, 1:100 Proteinase-Inhibitor-Cocktail) nach Absaugung des Waschpuffers auf das Zellpellet geben. Vorsichtig mit der Pipette homogenisieren. 20-60min auf Eis inkubieren. 10µl (auf 1ml) 10% NP40 in Puffer 1 dazugeben und weitere 3-20min auf Eis inkubieren und dann 2min bei 1800rpm in der Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugieren. Den Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen (das Pellet aufbewahren) und erneut für 10min bei 13000rpm zentrifugieren und nochmals in ein neues Eppendorfgefäß überführen. Dieser Überstand ist die zytosolische Fraktion, welche aber auch kleine Organellen, wie z.B. die Mitochondrien enthält. Beide gewonnenen Zellpellets, welche die Zellkerne und die Membrantrümmer beinhalten, werden zweimal mit PBS gewaschen und dann wiederum verglichen mit dem Zellpellet mit zweimal mehr hyperosmolarem Puffer 2 (optional direkt vor dem Versuch frisch dazugeben: 1mM PMSF, 1mM Vanadat, 0,1mM Pervanadat, 1mM DTT, Proteinase-Inhibitor-Cocktail 1:100) behandelt und 20min auf Eis inkubiert (dabei gelegentlich durch Schwenken das Gefäß mischen). 10min bei 13000rpm zentrifugieren. Der Überstand enthält die löslichen Kernproteine, das Pellet enthält unlösliche Chromatin- und Membranreste. Soll von

der Kernfraktion eine Proteinbestimmung gemacht werden, so muss auf das Glycerin in Puffer 2 weitestgehend verzichtet werden (max. 10% Glycerin (normal 20%)) für die Konzentrationsbestimmung mit der BCA- oder Bradford-Methode).

### 2.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt mithilfe der Bradford-Methode. Coomassie Brilliant Blue G-250 wird durch Bindung an ein Protein vom kationischen in den anionischen Zustand überführt. Die Absorption kann bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen werden.

kationisch	neutral	anionisch
47nm (rot)	650nm (grün)	595nm (blau)

Für die Bestimmung der Konzentration muss parallel eine Standardreihe mit BSA bekannter Konzentrationen angefertigt und gemessen werden.

### 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt mit dem System der Firma BioRad, München. Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel werden nacheinander hergestellt und nacheinander zwischen die vorbereiteten Gelplatten gegossen. Die aufzutrennenden Protein-Solubilisate werden mit reduzierendem 5-fach konzentriertem Probenpuffer im Verhältnis 1:5 gemischt und mit *aqua dest.* auf ein gut pipettierbares Volumen gebracht. Anschließend werden die Solubilisate für 5min bei 95°C im Heizblock gekocht und in die Taschen der Gele pipettiert. Das Einlaufen der Proteine in das Sammelgel erfolgt bei einer konstanten Spannung von 80V. Anschließend wird die Spannung auf 100V erhöht, wobei die Auftrennung der Proteine über einen Zeitraum von ungefähr 90min erfolgt.

#### 2.2.4.2 Western Blot-Versuch

Mit der Western Blot-Apparatur der Firma BioRad, München wird das Gel direkt nach der elektrophoretischen Auftrennung im Sandwich-Verfahren blasenfrei auf die

Nitrocellulose-Membran überführt. Die Membran zeigt beim Blotten zur Anode. Der Transfer wird im Blotpuffer eisgekühlt für mindestens 1h bei konstanter Stromstärke von 0,25mA durchgeführt. Nach dem Transfer werden die Proteine auf der Membran reversibel mit PonceauS gefärbt, um den Proteingehalt bzw. die Gleichmäßigkeit des Transfers zu kontrollieren. Nach Entfärbung der Proteine mit TBS/0,1% Tween-Puffer wird die Membran für mind. 30min mit 5% BSA/TBS/0,1% Tween-Puffer blockiert und über Nacht bei 3°C mit dem Primär-Antikörper inkubiert. Am Folgetag wird die intensiv mit TBS/0,1% Tween-Puffer gewaschene Membran für 1h mit dem Sekundär-Antikörper bei Raumtemperatur (RT) behandelt. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS/0,1% Tween-Puffer können die Blots ausgewertet werden. Die gleichmäßige Beladung wird über das Housekeeping-Protein (Ladekontrolle) bestimmt. Die Banden von Interesse, werden mithilfe des Programmes ImageJ quantifiziert und auf die gleiche Menge und denselben Zeitpunkt normiert.

#### 2.2.4.3 Indirekter Immunfluoreszenz-Versuch

In einem Acht-Kammer-Objektträger-System der Firma Thermo Fisher Scientific (Schwerte) wird eine definierte Zellzahl bei 37°C bis zur 80%-Konfluenz kultiviert. Das weitere Vorgehen entspricht dem Ablauf der Stimulation (Abbildung 2.3) mit den angegebenen Konzentrationen der Zytokine aus der Tabelle 2.10.

Kontrolle (Medium)	Inositol-C2- PAF (2,5µM)	Zytokin (10ng/ml)/ (20ng/ml)	Inositol-C2- PAF (2,5µM)+ Zytokin (10ng/ml)/ (20ng/ml)
-----------------------	--------------------------------	------------------------------------	--

**Abbildung 2.3:** Prinzipieller Versuchsaufbau für den indirekten Immunfluoreszenz-Versuch.

Nach der Stimulation werden die Zellen ausreichend mit PBS gewaschen, um danach für 30min bei RT mit 200µl PFA/Saponin 0,0025% fixiert zu werden. Zwei weitere Waschschriffe mit PBS folgen. Mit 200µl 1% BSA/PBS werden die Zellen für 30min bei RT blockiert. Drei Waschschriffe bei RT mit PBS à 10min müssen durchgeführt werden, bevor der Primär-Antikörper in 1% BSA/PBS über Nacht bei 3°C auf der

---

Wippe inkubiert. Nach der Inkubation müssen die Zellen erneut dreimal à 1min gewaschen werden, zweimal mit PBS und abschließend mit PBS/0,1% Tween-Puffer. Der Sekundär-Antikörper wird in den angegebenen Verdünnungen laut Hersteller in 1% BSA/PBS angesetzt und für 1h bei RT im Dunkeln auf der Wippe inkubiert. Drei letzte Waschschrirte folgen, einmal mit PBS/0,1% Tween-Puffer und zweimal mit PBS à 10min. Die Kammer wird vorsichtig abgelöst, um den Objektträger ausreichend über Nacht trocknen lassen zu können. Dieser kann am Folgetag eingedeckt und nach Aushärtung des Eindeck-Mediums ausgewertet werden.



## 3 Ergebnisse

Um den Einfluss des glykosidierten Phospholipids Inositol-C2-PAF auf NF $\kappa$ B $\alpha$ , seine Regulatormoleküle I $\kappa$ B $\alpha$  bzw. phosphoryliertes I $\kappa$ B $\alpha$ , sowie STAT1 zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen bis zur Subkonfluenz kultiviert und anschließend mit dem jeweiligen Zytokin in An- bzw. Abwesenheit von Inositol-C2-PAF für 15min, 60min, 24h und 48h stimuliert. Die daraus gewonnenen Zelllysate wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht. Bei den Kurzzeitinkubationen über 15min und 60min wurden die Zellen vorab mit 5 $\mu$ M Inositol-C2-PAF für 1h präinkubiert und erst danach mit dem jeweiligen Zytokin über die jeweilige Zeitspanne stimuliert.

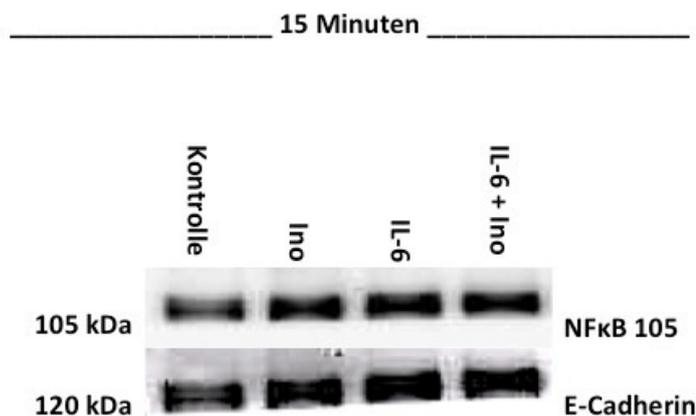
### 3.1 Untersuchungen zum Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B

#### 3.1.1 Der Einfluss von IL-6 auf die Expression der p105-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF in humanen Keratinozyten *in vitro* im Western Blot-Verfahren

Die NF $\kappa$ B p105-Expression, dem Vorläufer der p50-Untereinheit, wurde in HaCaT-Zellen, die bis zur Subkonfluenz kultiviert wurden mittels Western Blot-Verfahren untersucht. Dafür wurden die Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die Membranen mit einem Antikörper, der spezifisch gegen die p105-Untereinheit gerichtet ist, inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels geeigneten sekundären Antikörper. Die Zellen wurden hierfür vorneweg für 15min, 60min sowie für 24h und 48h mit IL-6 (10ng/ml) in An- und Abwesenheit von 5 $\mu$ M

Inositol-C2-PAF inkubiert. Die Zellen, die der Kurzzeitstimulationen unterzogen wurden, wurden vorab mit 5 $\mu$ M Inositol-C2-PAF für 1h präinkubiert. Erst danach erfolgte die Stimulation für 15min bzw. 60min mit dem Zytokin IL-6 (10ng/ml). Als Kontrolle wurden jeweils unbehandelte Zellen mitgeführt.

Die Auswertungen der Banden ergeben, dass die Expression der p105-Untereinheit nach 15min, weder durch IL-6 noch durch Inositol-C2-PAF beeinflusst wird (Abbildung 3.1). Im Bezug auf die Kontrolle kommt es zwar zu einer sichtbaren Zunahme der Bandenstärke durch die Behandlung der Zellen mit Inositol-C2-PAF und/oder IL-6 im Blot, doch ist im direkten Vergleich der Banden der stimulierten Zellen mit Inositol-C2-PAF und/oder IL-6 allerdings keine Zu- oder Abnahme der Signalintensität zu beobachten. Inositol-C2-PAF scheint demnach keinen Einfluss auf die Expression des Vorläufermoleküls p105 nach einer Stimulation über 15min zu haben.

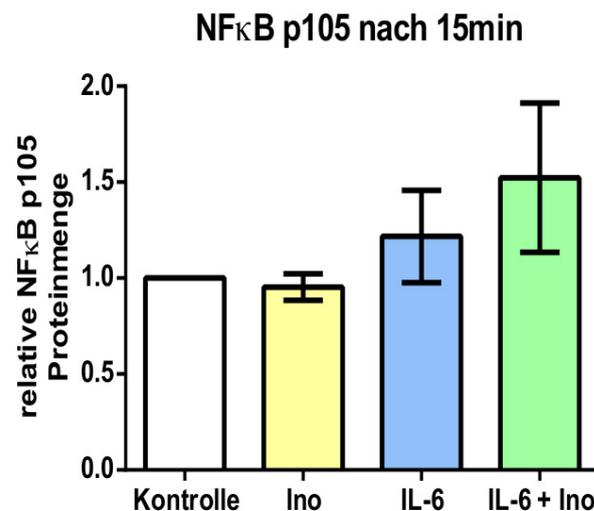


**Abbildung 3.1:** Die Expression des Proteins NFκB p105 in HaCaT-Zellen im Western Blot nach einer Inkubation über 15min.

Die HaCaT-Zellen wurden nach einer einstündigen Vorinkubation mit Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) für weitere 15min in An- und Abwesenheit von IL-6 (10ng/ml) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Das Membranprotein E-Cadherin dient hierbei als Ladekontrolle zum Nachweis gleicher Proteinmengen. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus n=3 Versuchen.

Zur Quantifizierung der NFκB p105-Signale im Western Blot wurden die Banden densitometrisch ermittelt und ausgewertet. Diese wurden dann auf die Bande der jeweiligen Ladekontrolle bezogen. Die Expression des dafür verwendeten Proteins wird nicht vom eingesetzten Zytokin reguliert und sollte unter den verschiedenen Bedingungen

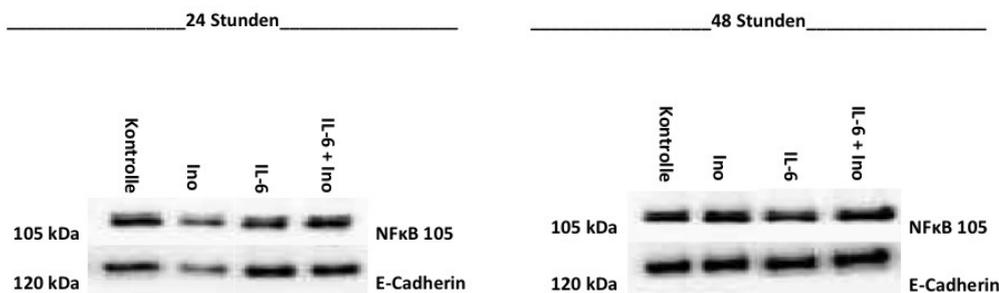
in annähernd gleicher Menge exprimiert werden. Sie dient damit als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Elektrophoresegels. Kommt es trotzdem zu Abweichungen in der Menge der Ladekontrolle, kann durch die Quantifizierung der Ladekontrolle die Menge des zu bestimmenden Proteins angepasst und normalisiert werden. Dieser Wert, ermittelt im Kontrollansatz, stellt den Referenzwert dar und wird auf 1,00 festgesetzt. Gleiche Experimente wurden anschließend zu einem relativen Mittelwert zusammengefasst und die Standardabweichung bestimmt. Die in Abbildung 3.2 dargestellte Quantifizierung der Banden zeigt nach 15min keinen Anstieg der relativen Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle durch Stimulation mit Inositol-C2-PAF. Werden die Zellen nur mit IL-6 behandelt ist ein Anstieg von 1,0 auf 1,25 zu verzeichnen. Durch die Zugabe von Inositol-C2-PAF erhöht sich diese weiter auf 1,5. Bezugnehmend auf die Fehlerbalken sind die genannten Veränderungen jedoch nur gering. Mit einem p-Wert von 0,3512 ist der Versuch nicht signifikant. Somit haben weder IL-6 noch Inositol-C2-PAF nach einer Kurzzeitstimulation über 15min einen Einfluss auf die Expression der NF $\kappa$ B p105-Untereinheit und bestätigen die Tendenz der Blots.



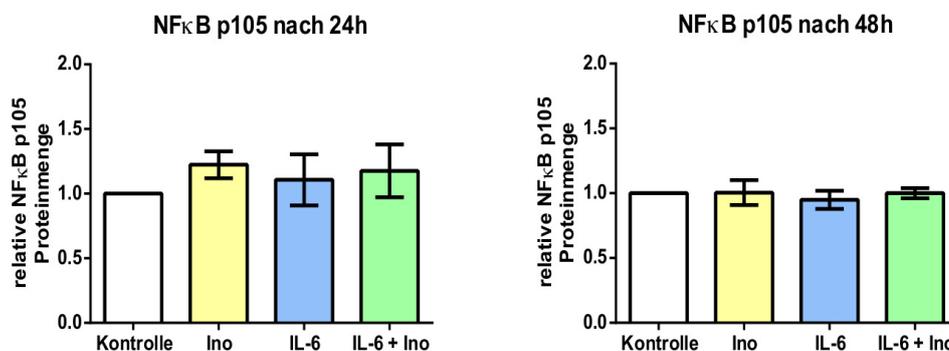
**Abbildung 3.2:** Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der Expression von NF $\kappa$ B p105 nach 15min (n=3 Versuche).

Werden die Zellen für 24h oder 48h unter den in Abbildung 3.3 beschriebenen Bedingungen inkubiert, zeigt sich ebenfalls keine Veränderung der Bandenstärke im Vergleich zur Kontrollbande. Die Abnahme der Bandenintensität nach 24h bei den nur mit Inositol-C2-PAF behandelten Zellen relativiert sich durch die geringere Proteinmenge

der darunterliegenden Ladekontrolle, was die anschließende Quantifizierung (Abbildung 3.4) bestätigt. Die Auswertung der Blots zeigt, dass die relative Proteinmenge, sowohl nach 24h als auch nach 48h im Vergleich zur Kontrolle konstant bleibt. Auch hier ist kein Effekt durch Inositol-C2-PAF zu beobachten. Der p-Wert der Versuche beträgt über 24h 0,7479 und über 48h 0,9092. Die Ergebnisse sind dem nach ebenfalls nicht signifikant.



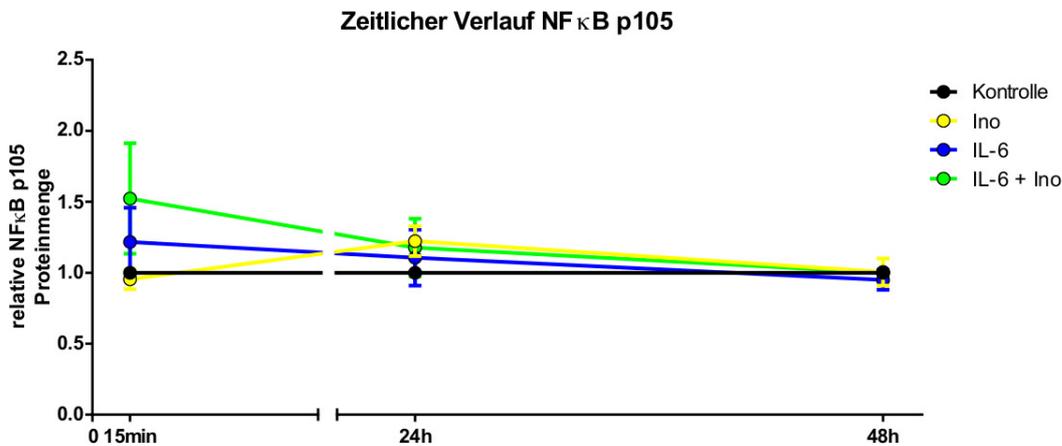
**Abbildung 3.3:** Die NFκB p105-Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot nach einer Inkubation über 24h und 48h. Die HaCaT-Zellen wurden mit IL-6 (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5μM) für 24h bzw. 48h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. E-Cadherin dient zum Nachweis gleicher Proteinmengen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus n=3 Versuchen.



**Abbildung 3.4:** Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der Expression von NFκB p105 nach 24h und 48h (n=3 Versuche).

Zusammenfassend erkennt man im Vergleich zur Kontrolle durch die Behandlung der HaCaT-Zellen mit IL-6 (10ng/ml) in Anwesenheit von Inositol-C2-PAF (5μM) einen Anstieg der p105-Expression um 50%, der sich allerdings durch die hohen Fehlerbalken

relativiert. Zudem verliert sich der Anstieg über den zeitlichen Verlauf hin und findet sich nach 48h auf Höhe der Kontrolle wieder (Abbildung 3.5).

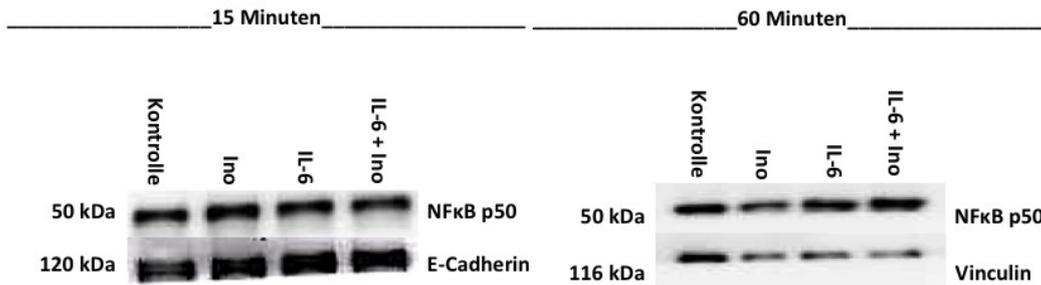


**Abbildung 3.5:** Graphische Zusammenfassung der NF $\kappa$ B p105-Expression über den zeitlichen Verlauf von 15min bis hin zu 48h Inkubation mit dem Zytokin IL-6 (10ng/ml) und Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (n=3 Versuche).

### 3.1.2 Der Einfluss von IL-6 auf die Expression der p50-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF

Um die Expression der prozessierten NF $\kappa$ B p50-Untereinheit in HaCaT-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen bis zur Subkonfluenz kultiviert und über 15min, 60min, 24h und 48h mit dem Zytokin IL-6 (10ng/ml) in An- und Abwesenheit von 5 $\mu$ M Inositol-C2-PAF behandelt und mittels Western Blot-Versuch und einem spezifischen Antikörper, der gegen die p50-Untereinheit gerichtet ist, untersucht. Die Zellen, die der Kurzzeitstimulationen unterzogen wurden, wurden vorab mit 5 $\mu$ M Inositol-C2-PAF für eine Stunde präinkubiert. Erst danach erfolgte die Stimulation für 15min bzw. 60min mit dem Zytokin IL-6 (10ng/ml). Nach 15-minütiger Inkubation der HaCaT-Zellen erkennt man im Vergleich zu den Banden der unbehandelten Kontroll-Zellen keine Veränderung in der Signalintensität der NF $\kappa$ B p50-Untereinheit im Western Blot durch die Behandlung mit Inositol-C2-PAF und/oder IL-6. Somit scheinen weder IL-6 noch Inositol-C2-PAF einen Effekt auf die Menge der NF $\kappa$ B p50-Untereinheit

nach einer Inkubation über 15min zu haben. Nach 60min kommt es zu einer Abnahme der Bandenintensität der nur mit Inositol-C2-PAF behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Durch die alleinige Stimulation mit IL-6 nimmt die Menge an NFκB p50 wiederum stark zu und wird durch die zeitgleiche Stimulation mit Inositol-C2-PAF nochmal minimal erhöht (Abbildung 3.6).



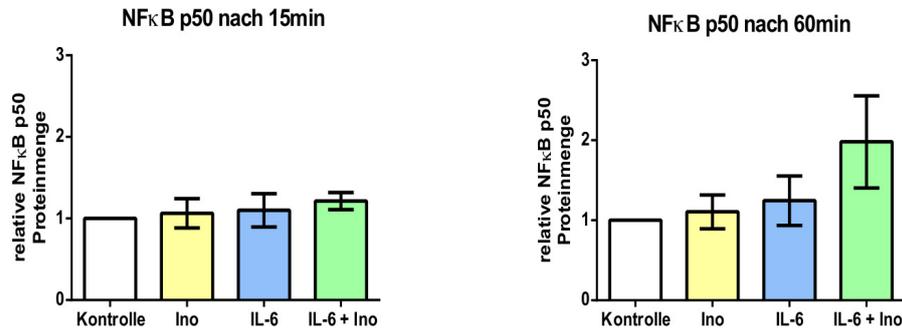
**Abbildung 3.6:** Die Expression der NFκB p50-Untereinheit in HaCaT-Zellen im Western Blot nach einer Inkubation über 15min und 60min.

Die HaCaT-Zellen wurden nach einer einstündigen Vorinkubation mit Inositol-C2-PAF (5μM) für weitere 15min bzw. 60min in An- und Abwesenheit von IL-6 (10ng/ml) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. E-Cadherin und Vinculin dienen jeweils zum Nachweis gleicher Proteinmengen.

Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus n=3 Versuchen bei der Stimulation über 15min und n=2 Versuchen bei der Stimulation über 60min.

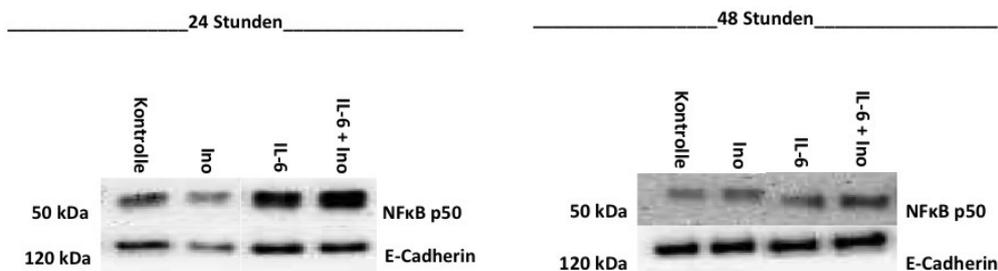
Die Abbildung 3.7 gibt die Auswertung der Blots nach 15- und 60-minütiger Inkubation wieder. Wie das Ergebnis der Blots schon gezeigt hat, zeigen sich keine gravierenden Veränderungen in der Stärke der Banden nach 15min und damit auch keine Signifikanz (p-Wert 0,7719). Die beobachtete Zunahme der NFκB p50-Expression der Blots bei gleichzeitiger Inkubation mit IL-6 und Inositol-C2-PAF nach 60min im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit IL-6 oder Inositol-C2-PAF sowie zur Kontrolle spiegelt sich auch in der Quantifizierung wieder, durch einen Anstieg der relativen Proteinmenge von 1,2 auf 2,0 (Abbildung 3.7), sind aber ebenfalls nicht signifikant (p-Wert 0,2516).

Nach der Stimulation über 24h erkennt man wie nach der Stimulation über 60min eine Abnahme der Bandenstärke bei den nur mit Inositol-C2-PAF behandelten Zellen im



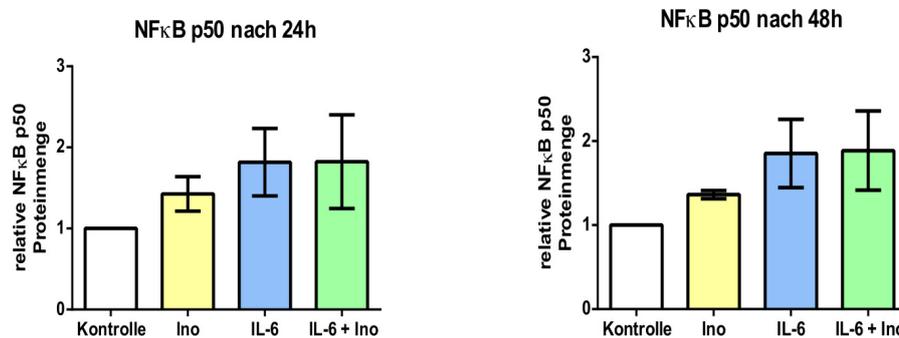
**Abbildung 3.7:** Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der Expression von NFκB p50 nach 15min und 60min (n=3 Versuche bei der Stimulation über 15min und n=2 Versuche bei der Stimulation über 60min).

Vergleich zur Kontrolle. Durch die alleinige Behandlung mit IL-6 sieht man wiederum eine deutliche Zunahme der NFκB p50-Untereinheit. Die zusätzliche Behandlung mit Inositol-C2-PAF hat auch hier nur einen schwachen Einfluss auf die Signalintensität (Abbildung 3.8). Dieser Effekt relativiert sich jedoch durch die Schwankungen in der darunter abgebildeten Ladekontrolle. Die Stimulation über 48h zeigt, dass die Menge an NFκB p50 in den nur mit Inositol-C2-PAF-behandelten Zellen, sowie in den nur mit IL-6-behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen nur minimal zuzunehmen scheint. Die Inkubation mit IL-6 und Inositol-C2-PAF führt aber unter diesen Bedingungen zu einer stärkeren Zunahme der Signalintensität (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** Die NFκB p50-Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot nach einer Inkubation über 24h und 48h. Die HaCaT-Zellen wurden mit IL-6 (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5μM) für 24h bzw. 48h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. E-Cadherin dient zum Nachweis gleicher Proteinmengen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus n=3 Versuchen.

Die quantitative Auswertung der Blots nach 24h und 48h stellt die Abbildung 3.9 dar.



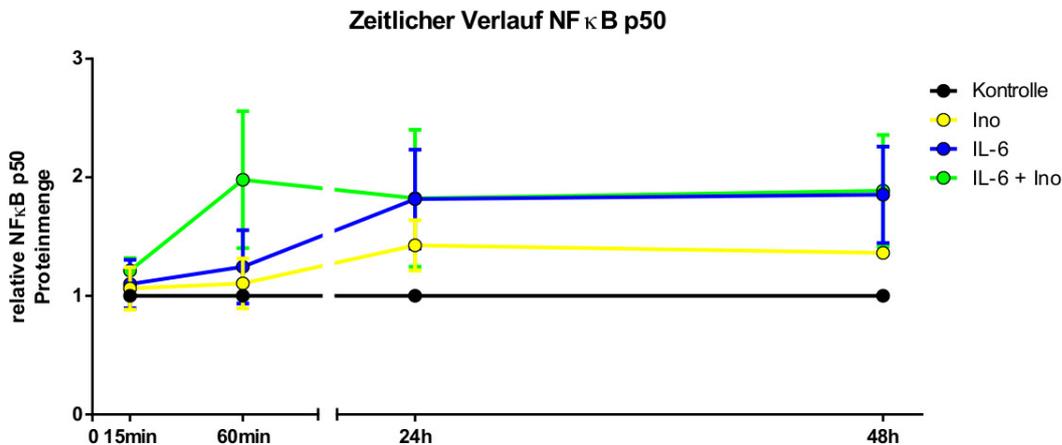
**Abbildung 3.9:** Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der Expression von NFκB p50 nach 24h und 48h (n=3 Versuche).

Nach 24h bleibt die relative Proteinmenge nach Zugabe von Inositol-C2-PAF im Gegensatz zur Kontrolle nahezu konstant. IL-6 erhöht die Menge an NFκB p50 geringfügig. Die gleichzeitige Gabe von IL-6 und Inositol-C2-PAF hat keinen Einfluss auf die Expression des Proteins im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit IL-6. Die quantitative Auswertung der Blots nach 48h zeigt ein ähnliches Bild wie die Auswertung der Inkubation über 24h. Beide Stimulationen sind demnach nicht signifikant (24h:p-Wert 0,4005; 48h:p-Wert 0,2168).

Zusammenfassend kann man sagen, dass nach 15min, 60min, 24h und 48h jeweils ein Anstieg durch die Stimulation mit IL-6 im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen ist (Abbildung 3.10). Zu allen anderen angegebenen Zeitpunkten bleibt die relative Proteinmenge durch Zugabe von Inositol-C2-PAF im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit IL-6 stabil, d.h. die Proteinmenge an NFκB p50 wird durch das Phospholipid Inositol-C2-PAF nicht beeinflusst.

### 3.1.3 Untersuchungen zum Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Verteilung der NFκB p105-Untereinheit zwischen Zytosol und Zellkern

Die Proteine NFκB p105 und p100 sind Vorläufermoleküle, aus denen die nicht-Rel-Proteine p50 und p52 mittels limitierter Proteolyse entstehen. Da NFκB p105 als Prekursor-Molekül im Zytosol abgebaut wird, sollte es nicht im Zellkern lokalisiert

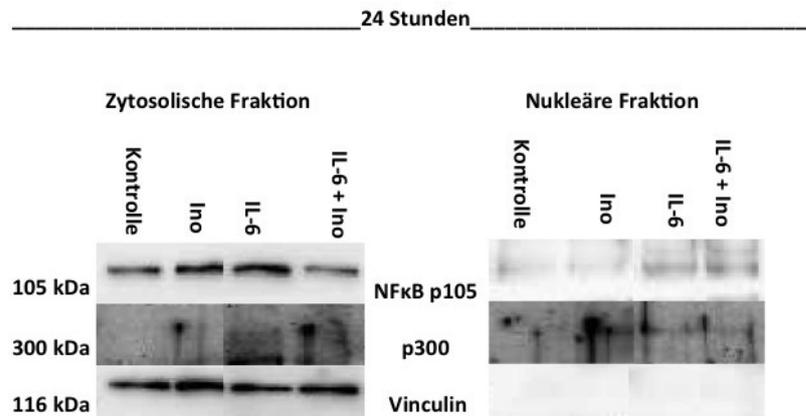


**Abbildung 3.10:** Graphische Zusammenfassung der NF $\kappa$ B p50-Expression über den zeitlichen Verlauf von 15min bis 48h nach Inkubation mit dem Zytokin IL-6 (10ng/ml) in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (n=3 Versuche).

sein. Um Aufschluss zu erhalten, ob Inositol-C2-PAF einen Einfluss auf die Verteilung von p105 und p50 im Zytosol und im Zellkern hat, wurden HaCaT-Zellen über 24h unbehandelt, mit Inositol-C2-PAF, mit IL-6 und mit IL-6 und Inositol-C2-PAF inkubiert. Anschließend wurden Kern-/Zytosol-Fraktionierungen durchgeführt und mittels Western Blot-Verfahren analysiert. Die Membranen wurden mit einem Antikörper der spezifisch gegen die p105- bzw. die p50-Untereinheit gerichtet ist, inkubiert. Der Protein-Nachweis erfolgte mittels eines geeigneten sekundären Antikörpers.

Als Ladekontrolle für die zytosolische Fraktion diente Vinculin, als Marker der Kernfraktion wurde das Protein p300 gewählt, das als Histon-Acyltransferase im Kern fungiert (Abbildung 3.11).

Leider war die Proteinkonzentration der Kernfraktion so gering, dass der spezifische Nachweis des p300 sehr schwierig war. Jedoch konnte in der Kernfraktion das zytosolische Protein Vinculin und in der Zytosolfraktion das p300 nicht nachgewiesen werden, während sich Vinculin in der Zytosolfraktion und p300 (schwach) in der Kernfraktion nachweisen ließ. In der zytosolischen Fraktion erkennt man eine Zunahme der Bandenstärke durch Inkubation mit Inositol-C2-PAF, sowie mit IL-6 und deutlich eine Abnahme des Signals bei gleichzeitiger Behandlung mit IL-6 und Inositol-C2-PAF im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 3.11). In der nukleären Fraktion, in der kein Signal des zytosolischen Proteins Vinculin und schwache Banden für p300 nachweisbar



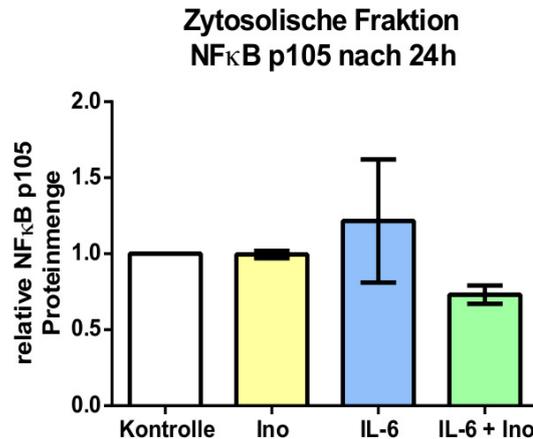
**Abbildung 3.11:** Die NF $\kappa$ B p105-Expression in der zytosolischen und nukleären Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot-Versuch nach Inkubation über 24h. Die HaCaT-Zellen wurden mit IL-6 (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) für 24h inkubiert. Vinculin und p300 dienen zum Nachweis der Reinheit der Auftrennung. Dargestellt ein repräsentativer Blot aus n=2 Versuchen.

sind, ist NF $\kappa$ B p105 nur sehr schwach bis gar nicht in der Fraktion zu erkennen (Abbildung 3.11) Leichte Verunreinigungen in der nukleären Fraktion können zu diesem Ergebnis führen.

Die Quantifizierung der zytosolischen NF $\kappa$ B p105-Signale bestätigt den Eindruck der Blots, dass die relative Proteinmenge in der zytosolischen Fraktion der IL-6-behandelten Zellen deutlich von 1,25 auf 0,75 durch zusätzliche Gabe von Inositol-C2-PAF abnimmt (Abbildung 3.12).

### 3.1.4 Untersuchungen zum Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Verteilung der NF $\kappa$ B p50-Untereinheit zwischen Zytosol und Zellkern

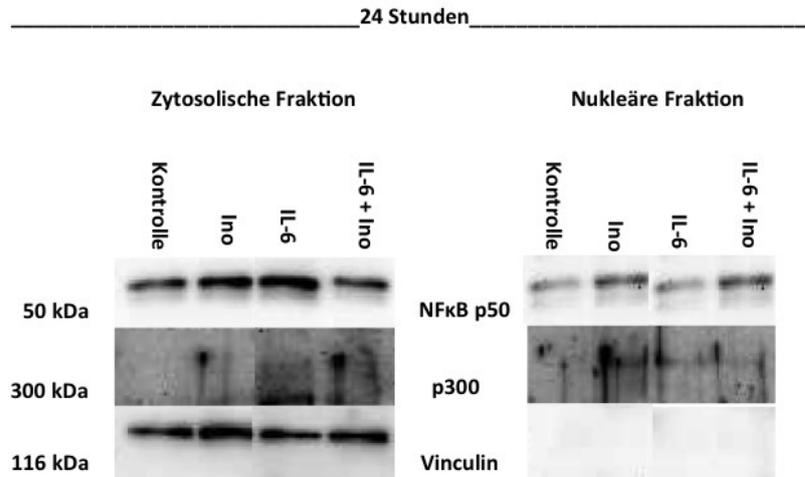
Um zu untersuchen, ob Inositol-C2-PAF einen Einfluss auf die Translokation der p50-Untereinheit in den Zellkern hat, wurde eine Kern-/Zytosol-Fraktionierung von den Zellen, die 24h behandelt wurden, durchgeführt und mittels Western Blotting analysiert. Als Ladekontrolle für die zytosolische Fraktion diente Vinculin, als Marker der Kernfraktion wurde das Protein p300 gewählt (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.12:** Quantifizierung des Western Blot-Versuchs zum Nachweis der NFκB p105-Expression in der zytosolischen Fraktion nach 24h. Inositol-C2-PAF hat nach 24h Inkubation sichtbar einen Effekt auf die IL-6-abhängige NFκB p105-Expression mit einer Abnahme der relativen Proteinmenge von 1,25 auf 0,75 in der zytosolischen Fraktion. In der nukleären Fraktion lässt sich NFκB p105 nicht nachweisen und wird daher nicht quantifiziert. (n=2 Versuche)

Auch hier war die Proteinkonzentration der Kernfraktion so gering, dass der spezifische Nachweis des p300 sehr schwierig war. Jedoch konnte in der Kernfraktion das zytosolische Protein Vinculin und in der Zytosolfraction das p300 nicht nachgewiesen werden, während sich Vinculin in der Zytosolfraction und p300 (schwach) in der Kernfraktion nachweisen ließ. Die prozessierte p50-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB ist in der Kontrolle der zytosolischen Fraktion nach 24h nachweisbar. Durch die jeweilige Stimulation mit IL-6 oder Inositol-C2-PAF erhöht sich die Menge von NFκB p50 im Vergleich zu den Kontroll-Zellen. Werden IL-6-behandelte Zellen zusätzlich mit Inositol-C2-PAF inkubiert kommt es zu einer Abnahme der Signalintensität in der zytosolischen Fraktion (Abbildung 3.13). Betrachtet man die nukleäre Fraktion, ist auch hier NFκB p50-Protein nachweisbar, jedoch weniger, als in der Kontrolle der zytosolischen Fraktion. In der nukleären Fraktion steigt die Menge an NFκB p50 nach Stimulation mit Inositol-C2-PAF sowohl in den sonst unbehandelten Zellen, aber auch in den IL-6-behandelten Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

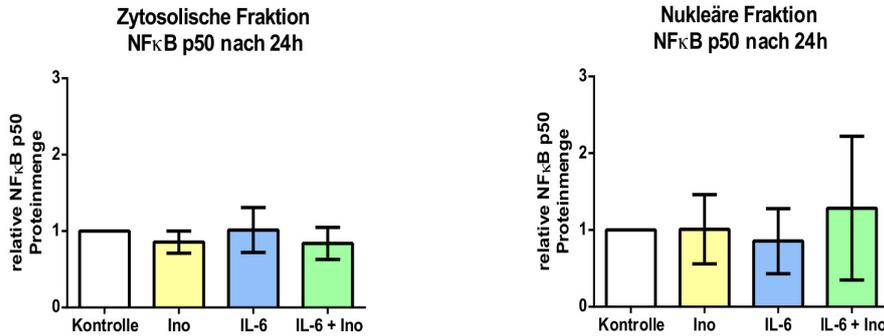
Nach Normalisierung auf die jeweiligen Ladekontrollen zeigt sich, dass sich die Menge der p50-Untereinheit über die zwei durchgeführten Versuche nach IL-6-Gabe innerhalb der zytosolischen Fraktion nicht ändert. Auch die Gabe von Inositol-C2-PAF hat kei-



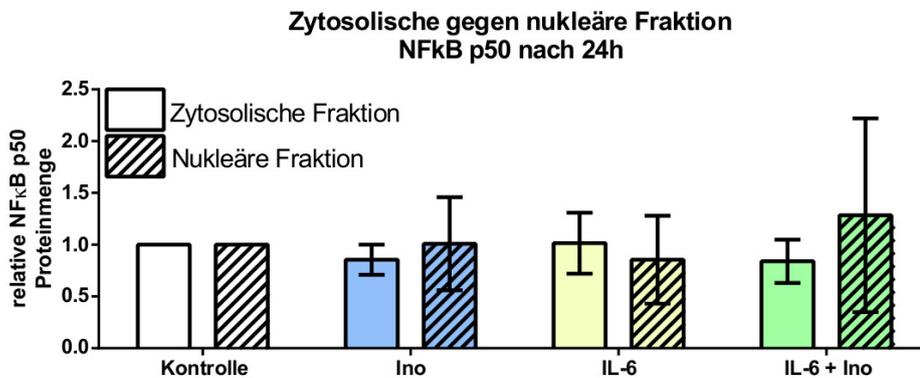
**Abbildung 3.13:** Die NF $\kappa$ B p50-Expression in der zytosolischen und nukleären Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h. Die HaCaT-Zellen wurden mit IL-6 (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) für 24h inkubiert. Vinculin und p300 dienen zum Nachweis der Reinheit der Auftrennung. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus n=2 Versuchen.

nen Einfluss auf die Verteilung der p50-Untereinheit innerhalb der zytosolischen Fraktion (Abbildung 3.14). Innerhalb der nukleären Fraktion kommt es zu einem Anstieg der p50-Untereinheit durch gleichzeitige Behandlung mit IL-6 und Inositol-C2-PAF. Die relative Proteinmenge steigt von 0,9 auf 1,3 (Abbildung 3.14). Sie bestätigt damit das Ergebnis der Blots. In Anbetracht der großen Fehlerbalken lässt dies nur eine vermehrte Prozessierung der p50-Untereinheit vermuten und müsste durch eine größere Anzahl an Versuchen bestätigt werden.

Trägt man die relativen Werte der Proteinmengen der zytosolischen und nukleären Werte im direkten Vergleich gegeneinander auf, zeigt sich, dass Inositol-C2-PAF die Translokation der p50-Untereinheit in den Zellkern forciert (Abbildung 3.15). Allerdings minimiert sich dieser Effekt in Anbetracht der hohen Fehlerbalken.



**Abbildung 3.14:** Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der NFκB p50-Expression in der zytosolischen und nukleären Fraktion nach 24h (n=2 Versuche).

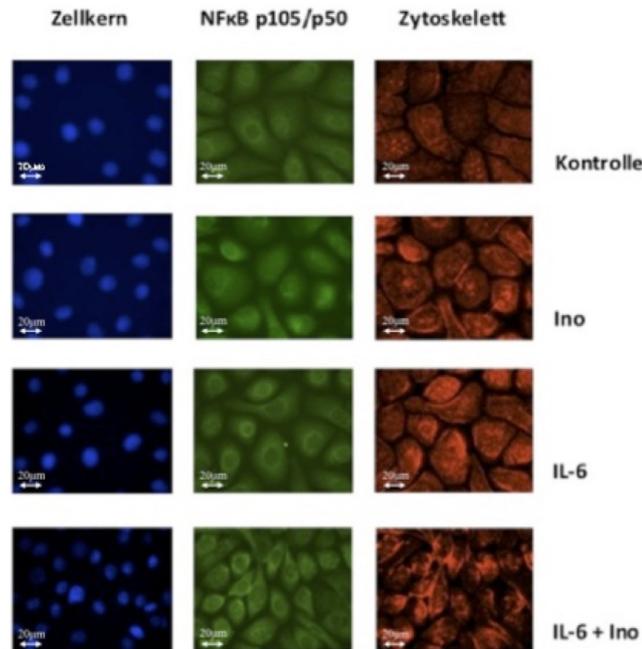


**Abbildung 3.15:** Die quantifizierte zytosolische und nukleäre Fraktion der NFκB p50-Expression der Western Blot-Versuche nach 24h im direkten Vergleich (n=2 Versuche).

### 3.1.5 Der Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors NFκB p105/p50 mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse

Für die Immunfluoreszenz-Analyse wurden die humanen Keratinozyten im subkonfluenten Zustand analysiert. Die Konzentration von Inositol-C2-PAF wurde mit 2,5μM etwas niedriger gewählt, da nach Austestung zu viele Zellen nach 24h auf dem Objektträger verstarben. Die IL-6-Konzentration wurde erhöht auf 20ng/ml, da nach Austestung bei dieser Konzentration ein deutlicherer Effekt auf die Lokalisation innerhalb der Zelle sichtbar wurde. Abbildung 3.16 zeigt die Lokalisation des Transkriptionsfaktors

NFκB p105/p50 (grün) innerhalb der Zelle nach Stimulation über 24h.

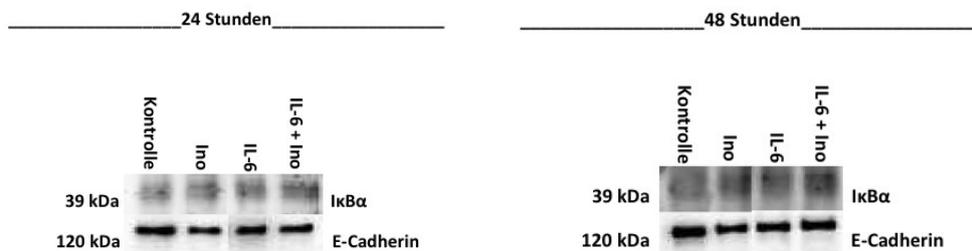


**Abbildung 3.16:** Die Expression von NFκB p105/p50 in HaCaT-Zellen im Immunfluoreszenz-Versuch nach 24h. Die Zellen wurden mit IL-6 (20ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (2,5µM) für 24h inkubiert. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus n=3 Versuchen.

Die blaue Färbung zeigt den Zellkern und die rote Färbung stellt das F-Aktin-Zytoskelett dar. Nach 24h Inkubation zeigt sich ein ähnlicher Effekt, wie in der Western Blot-Analyse. Die Stimulation mit IL-6 führt zu einer verstärkten Lokalisation von NFκB p105/p50 um den Zellkern herum. Dieser Effekt ist auch nach zusätzlicher Gabe von Inositol-C2-PAF unverändert und die verstärkte Lokalisation um den Zellkern herum ist weiterhin deutlich bzw. noch deutlicher sichtbar. Die Struktur des Zellkerns und des F-Aktin-Zytoskeletts sind nach den jeweiligen Behandlungen unverändert.

### 3.1.6 Der Einfluss von IL-6 auf die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$ in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF

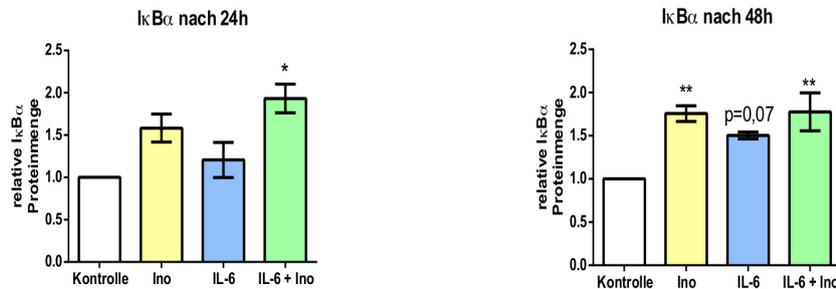
Im Ruhezustand bindet NF $\kappa$ B im Zytoplasma an das inhibitorische Protein I $\kappa$ B $\alpha$ , wodurch NF $\kappa$ B inaktiv ist und daran gehindert wird in den Zellkern zu gelangen (Baldwin (1996), Ghosh et al. (1998)). Eine Vielzahl von Signalen führen zur Phosphorylierung des gebundenen I $\kappa$ B $\alpha$  an Ser32 und Ser36 (Brockman et al. (1995), Brown et al. (1995)), der anschließenden Polyubiquitylierung und der damit verbundenen Degradation des Inhibitors durch das 26S-Proteasom (Beg et al. (1993), Courtois (2000)), wodurch NF $\kappa$ B aktiviert wird (Pahl (1999)). Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Expression in HaCaT-Zellen wurde ebenfalls auf Proteinebene im Western Blot-Verfahren mithilfe eines spezifischen Antikörpers analysiert. Die Stimulationszeiten betragen hierbei ebenfalls 24h und 48h. Die Konzentration von Inositol-C2-PAF betrug in allen Versuchen 5 $\mu$ M. Die Stimulation der HaCaT-Zellen über 24h und 48h erfolgte nach dem bereits beschriebenen Schema (Abbildung 3.17). Als Ladekontrolle diente in diesen Versuchen E-Cadherin. Nach 24h nimmt die Signalstärke des I $\kappa$ B $\alpha$  in allen Ansätzen in denen Zellen mit Inositol-C2-PAF behandelt wurden im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle leicht zu. IL-6 hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Expression des Proteins. Diese Tendenz verstärkt sich nach 48 h.



**Abbildung 3.17:** Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h und 48h. Die HaCaT-Zellen wurden mit IL-6 (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) für 24h und 48h inkubiert. E-Cadherin dient zum Nachweis gleicher Proteinmengen. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus n=3 Versuchen.

In der Quantifizierung zeigt sich die Zunahme der Bandenstärke durch eine Zunahme der relativen Proteinmenge der mit IL-6 und Inositol-C2-PAF behandelten Zellen bezogen auf die Kontrollen. Nach 24h steigt diese signifikant an von 1,0 relativer Pro-

teinmenge auf 1,9 (p-Wert <0,05), und nach 48h von 1,0 auf 1,8 an (p-Wert<0,01). Dieses bestätigt damit das Ergebnis der Blots (Abbildung 3.18).

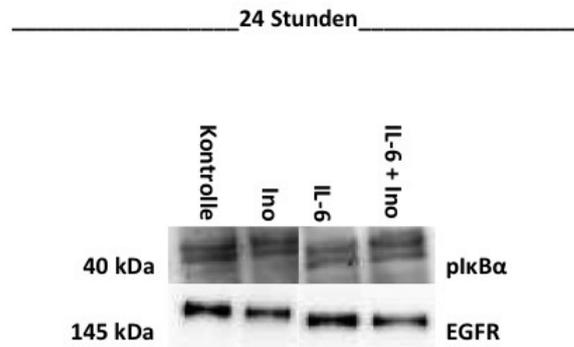


**Abbildung 3.18:** Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der IκBα-Expression nach 24h und 48h. Die mit \* (p < 0,05) oder mit \*\* (p < 0,01) versehenen Banden stellen Ergebnisse dar, die sich signifikant von den Kontroll-Zellen unterscheiden (n=3 Versuche).

### 3.1.7 Der Einfluss von IL-6 auf die Phosphorylierung von IκBα in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF

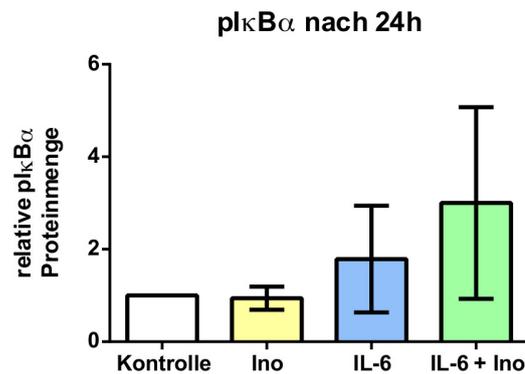
Die Phosphorylierung des IκBα, die die Degradation und damit die Aktivierung von NFκB einleitet, wurde in HaCaT-Zellen durch einen spezifischen Antikörper im Western Blot-Verfahren analysiert. Die Stimulationszeit betrug 24h. Die Konzentration von Inositol-C2-PAF betrug 5μM. Die Stimulation der HaCaTs über 24h erfolgte wie bereits erwähnt. In den Zellsolubilisaten lässt sich eine schwache Zunahme des phosphorylierten IκBα nach Stimulation mit Inositol-C2-PAF im Vergleich zu den Kontroll-Zellen über 24h verzeichnen. Es lässt sich ebenfalls eine schwache Zunahme in der Bandenintensität erkennen durch die gleichzeitige Stimulation mit IL-6 und Inositol-C2-PAF im Vergleich zu den nur mit IL-6-stimulierten Zellen (Abbildung 3.19).

Die in den Blots gemachten Beobachtungen werden durch die Quantifizierung der Banden teilweise bestätigt. Die zunehmende Bandenintensität der nur mit Inositol-C2-PAF-behandelten Zellen scheint sich durch die Normalisierung auf die Ladekontrolle auszugleichen. Allerdings ist der Anstieg der relativen Proteinmenge der mit IL-6 und Inositol-C2-PAF behandelten Zellen auch in der Quantifizierung deutlich zu erkennen. Die relative Proteinmenge steigt von 2,0 auf 3,0, demnach um 50% (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.19:** Der Phosphorylierungsstatus von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h. Die HaCaT-Zellen wurden mit IL-6 (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF ( $5\mu\text{M}$ ) für 24 Stunden inkubiert. EGFR dient zum Nachweis gleicher Proteinmengen. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus  $n=2$  Versuchen.

Die auch hier sehr hohen Fehlerbalken müssen durch eine höhere Anzahl von Versuchen minimiert werden.



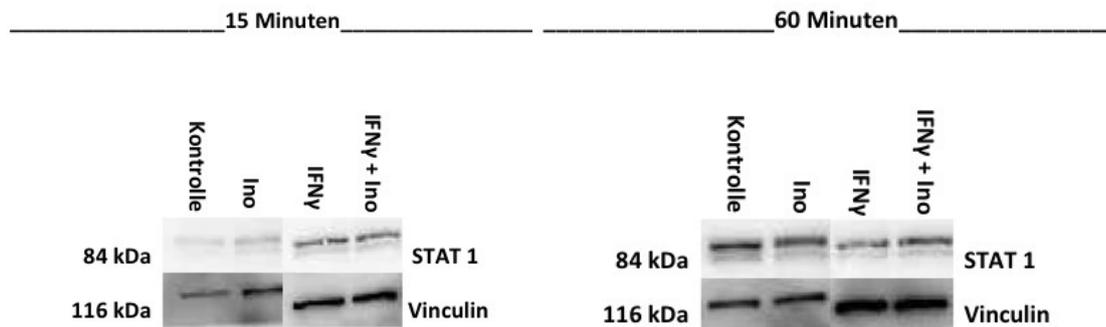
**Abbildung 3.20:** Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der pIκBα-Expression nach 24h. ( $n=2$  Versuche)

## 3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Transkriptionsfaktor STAT1

### 3.2.1 Der Einfluss von IFN $\gamma$ auf die Expression des Transkriptionsfaktors STAT1 in An- und Abwesenheit des Phospholipids Inositol-C2-PAF in humanen Keratinozyten *in vitro* im Western Blot-Verfahren

Inositol-C2-PAF hat, wie in anderen Arbeiten (Semini et al. (2011a), Stricker (2019)) bereits gezeigt, einen hemmenden Effekt auf die Phosphorylierung von STAT3 in der Keratinozyten-Zell-Linie HaCaT. Des Weiteren wird die Expression eines weiteren Familienmitglieds, STAT1, das ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese der *Psoriasis vulgaris* spielt (van der Fits et al. (2004), Eriksen et al. (2005), Rácz et al. (2011)), auf Transkriptionsebene durch Inositol-C2-PAF herunterreguliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich der Einfluss durch Inositol-C2-PAF auf STAT1 auch auf Proteinebene widerspiegelt. Auch hierfür wurde die Western Blot-Analyse gewählt, wobei ein spezifischer, gegen STAT1-gerichteter Antikörper eingesetzt wurde. Zur Stimulation wurde in den gemachten Versuchen das Zytokin IFN $\gamma$  gewählt, da es als Hauptaktivator des JAK-/STAT-Signalweges gilt. Die Stimulationszeiten betragen jeweils 15min, 60min, 24h und 48h und Inositol-C2-PAF wurde in allen Versuchen in einer Konzentration von 5 $\mu$ M eingesetzt. Die Zellen der Kurzzeitstimulation, die im eigentlichen Stimulationsversuch mit Inositol-C2-PAF für 15min und 60min behandelt wurden, wurden vorab mit 5 $\mu$ M Inositol-C2-PAF für eine Stunde präinkubiert. Erst danach erfolgte die eigentliche Stimulation mit dem Zytokin IFN $\gamma$  (10ng/ml) in An- und Abwesenheit von 5 $\mu$ M Inositol-C2-PAF für 15min und 60min. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Auch die Stimulation der HaCaT-Zellen über 24h und 48h erfolgte nach diesem Schema, allerdings ohne die Präinkubation mit Inositol-C2-PAF für 1h. Die Western Blot-Analyse zeigt, dass sich über einen Zeitraum von 15min die Expression des Transkriptionsfaktors STAT1 durch die alleinige Behandlung mit Inositol-C2-PAF im Vergleich zu den Kontroll-Zellen minimal erhöht, sichtbar als geringe Verstärkung der Bandenintensität. Dieses Ergebnis relativiert sich durch die gleichzeitige Zunahme in der Ladekontrolle. Bei gleichbleibender Ladekontrolle intensiviert sich allerdings die Bandenstärke weiter durch Behandlung mit IFN $\gamma$ . Die

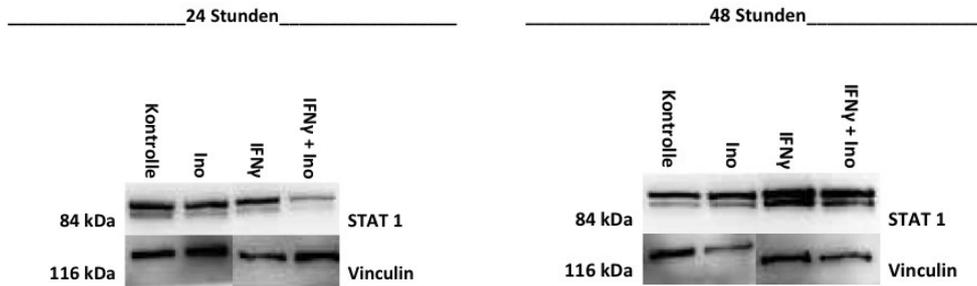
zusätzliche Gabe von Inositol-C2-PAF lässt wiederum nur eine geringe Abnahme des Transkriptionsfaktors STAT1 erahnen. Nach 60min Inkubation erkennt man ebenfalls eine Abnahme in der Intensität durch alleinige Behandlung mit Inositol-C2-PAF im Vergleich zu der Kontrolle. Im Gegensatz zu der Stimulation über 15min zeigt sich hier allerdings durch die alleinige Stimulation mit IFN $\gamma$  wiederum eine Abnahme der Bandenintensität, die durch Zugabe von Inositol-C2-PAF wiederum erneut zunimmt (Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21:** Die STAT1-Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot-Versuch nach 15min und 60min. Die Zellen werden mit IFN $\gamma$  (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) über 15min und 60min inkubiert. Vinculin dient zum Nachweis gleicher Proteinmengen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus n=2 Versuchen.

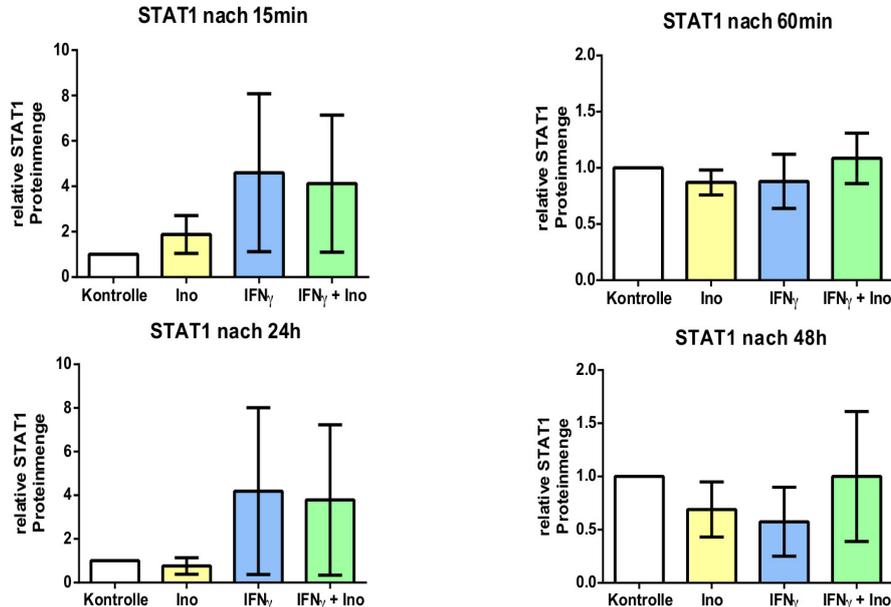
Nach Stimulation der Zellen über 24h lässt sich kein Unterschied in der Bandenintensität der nur mit Inositol-C2-PAF und der nur mit IFN $\gamma$ -behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle erkennen. In Anwesenheit von IFN $\gamma$  kommt es zu einer starken Abschwächung des STAT1-Signals durch Inositol-C2-PAF. Dieser Effekt lässt sich auch nach 48h noch schwach in den Blots erkennen (Abbildung 3.22).

Die anschließende Quantifizierung bestätigt die Ergebnisse der Blots. Die relative Proteinmenge der STAT1-Signale der mit Inositol-C2-PAF und IFN $\gamma$  behandelten Zellen nimmt im Vergleich zu den nur mit IFN $\gamma$  behandelten Zellen nach 15min von 4,5 auf 4 ab. Nach 60min kommt es, wie auch in den Blots ersichtlich, zu einer Zunahme von 0,9 relativer Proteinmenge auf 1,2. Die deutliche Abnahme der Bandenintensität bei Inkubation mit IFN $\gamma$  und Inositol-C2-PAF im Vergleich zu den nur mit IFN $\gamma$  behandelten Zellen ist in der Quantifizierung nicht mehr so deutlich zu erkennen, die



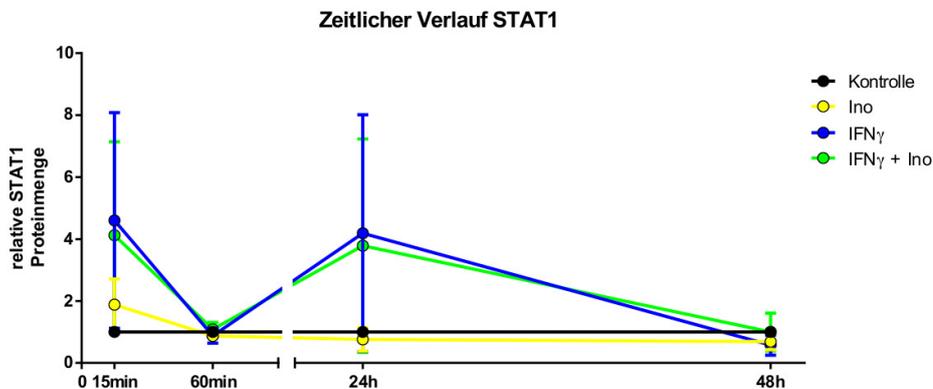
**Abbildung 3.22:** Die STAT1-Expression in HaCaT-Zellen im Western Blot-Versuch nach 24h und 48h. Die Zellen werden mit IFN $\gamma$  (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) über 24h und 48h inkubiert. Vinculin dient zum Nachweis gleicher Proteinmengen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus n=2 Versuchen.

relative Proteinmenge sinkt von 4,1 auf 4,0. Auch die Quantifizierung der Blots über 48h erscheint nach Normalisierung auf die Ladekontrolle anders. Es scheint eher zu einer Zunahme des Transkriptionsfaktors STAT1 durch die Stimulation mit IFN $\gamma$  zu kommen, die durch zusätzlich Gabe von Inositol-C2-PAF unbeeinflusst erscheint. Die relative Proteinmenge steigt von 0,5 auf 1,0 (Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.23:** Quantifizierung der Western Blots zum Nachweis der STAT1-Expression nach 15min, 60min, 24h und 48h (n=2 Versuche).

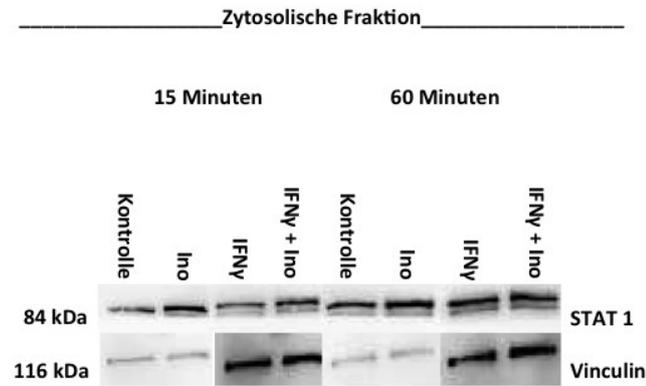
Dieser Effekt wird durch die sehr hohen Fehlerbalken minimiert und lässt dadurch kein eindeutiges Ergebnis erkennen (Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24:** Graphische Zusammenfassung der gezeigten Versuche über den zeitlichen Verlauf von 15min bis zu 48h Inkubation mit dem Zytokin IFN $\gamma$  (10ng/ml) und Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) (n=2 Versuche).

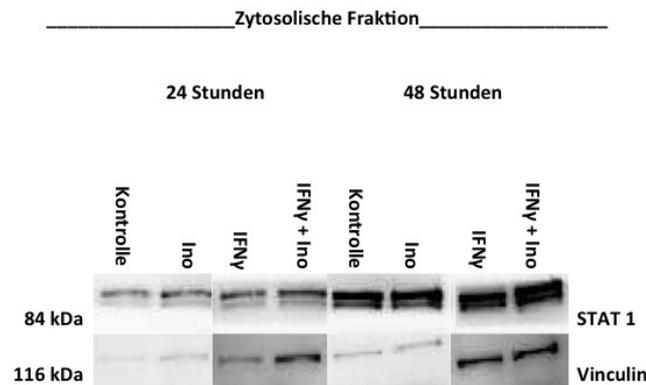
### 3.2.2 Untersuchungen zum Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Verteilung des Transkriptionsfaktors STAT1 innerhalb der Zelle

Um zu untersuchen, ob Inositol-C2-PAF möglicherweise einen Einfluss auf die Translokation des Transkriptionsfaktors STAT1 vom Zytosol in den Zellkern hat, wurde eine Kern-/Zytosol-Fraktionierung von den Zellen, die über 15min, 60min, 24h und 48h mit IFN $\gamma$  (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von 5 $\mu$ M Inositol-C2-PAF behandelt wurden, durchgeführt und mittels Western Blotting analysiert. Zur Überprüfung der Reinheit der Kern-/Zytosol-Trennung wurde die Kernfraktion auf Anwesenheit von Vinculin, einem zytosolischen Protein getestet. Es zeigt sich bei den nukleären Fraktionen ein Fehlen der Vinculinbande. Der Kernmarker wurde in diesen Versuchen nicht mitgeführt, da andere Antikörper getestet wurden, die auf der Höhe des Kernmarkers liefen. Nach 15min sieht man eine Zunahme der Bandenstärke durch alleinige Stimulation mit Inositol-C2-PAF im Vergleich zur Kontrolle, sowie durch die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit IFN $\gamma$  und Inositol-C2-PAF im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IFN $\gamma$ . Nach weiteren 45min, sowie nach 24h und 48h ist ein Unterschied in der Signalintensität nicht mehr sichtbar (Abbildung 3.25 und Abbildung 3.26).



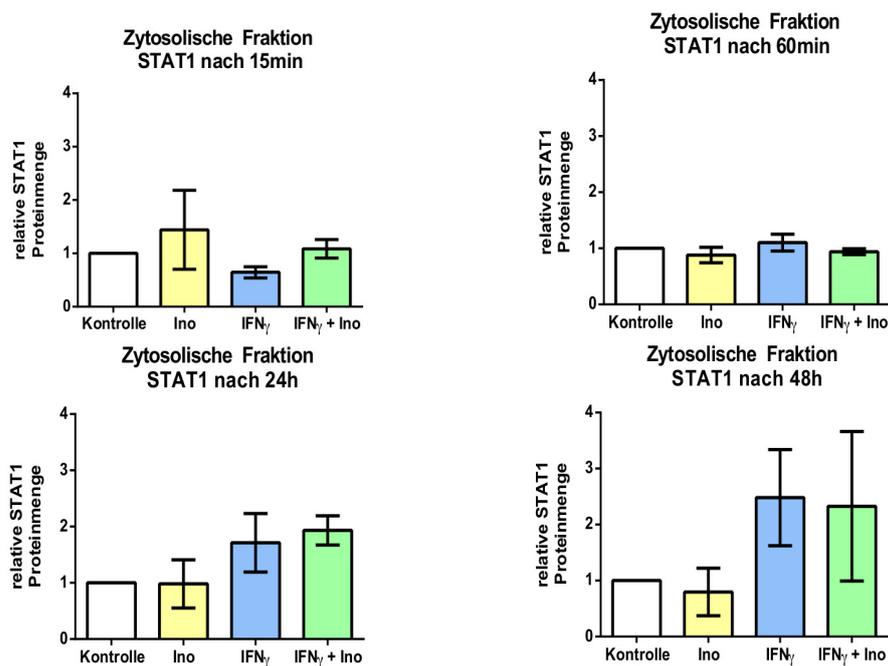
**Abbildung 3.25:** Die STAT1-Expression in der zytosolischen Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 15min und 60min. Die HaCaT-Zellen werden mit IFN $\gamma$  (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) für 15min und 60min inkubiert. Vinculin dient zum Nachweis gleicher Proteinmengen. Dargestellt ist ein repräsentiver Blot aus n=2 Versuchen.

In der Quantifizierung der STAT1-Signale im Zytosol zeigt sich nach 15min jeweils eine Zunahme der relativen Proteinmenge des Transkriptionsfaktors STAT1 durch Zugabe von Inositol-C2-PAF. Die relative Proteinmenge steigt von 1,0 der Kontroll-Zellen auf 1,5 durch Behandlung mit Inositol-C2-PAF bzw. von 0,5 der IFN $\gamma$  behandelten Zel-



**Abbildung 3.26:** Die STAT1-Expression in der zytosolischen Fraktion von HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h und 48h. Die HaCaT-Zellen wurden mit IFN $\gamma$  (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) für 24h und 48h inkubiert. Vinculin dient zum Nachweis gleicher Proteinmengen. Dargestellt ist ein repräsentiver Blot aus n=2 Versuchen.

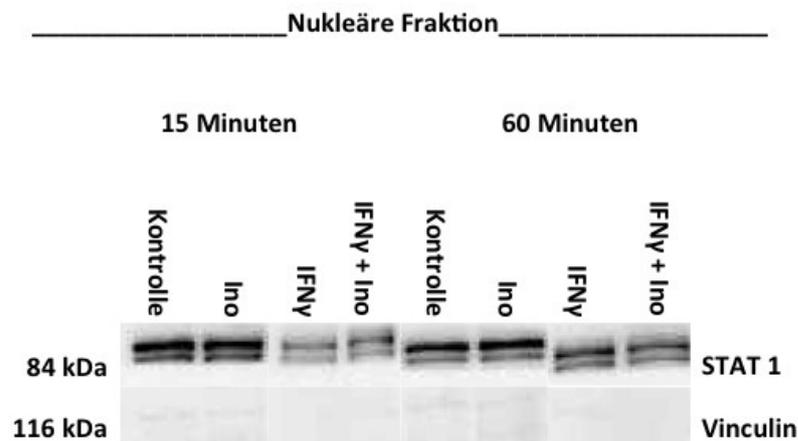
len auf 1,1 durch die gleichzeitige Stimulation über 15min. Nach 60min bestätigt die Quantifizierung das Bild der Blots. Es zeigen sich keine relevanten Veränderungen in der relativen Proteinmenge in dieser Zeit. Nach 24h und 48h lässt sich in der Quantifizierung im Vergleich zu der Kontrolle und den mit Inositol-C2-PAF-behandelten Zellen eine Zunahme des Transkriptionsfaktors STAT1 im Zytosol durch die Behandlung mit IFN $\gamma$  erkennen. Diese Zunahme wird durch Zugabe von Inositol-C2-PAF nicht weiter beeinflusst (Abbildung 3.27).



**Abbildung 3.27:** Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der STAT1-Expression in der zytosolischen Fraktion nach 15min, 60min, 24h und 48h (n=2 Versuche).

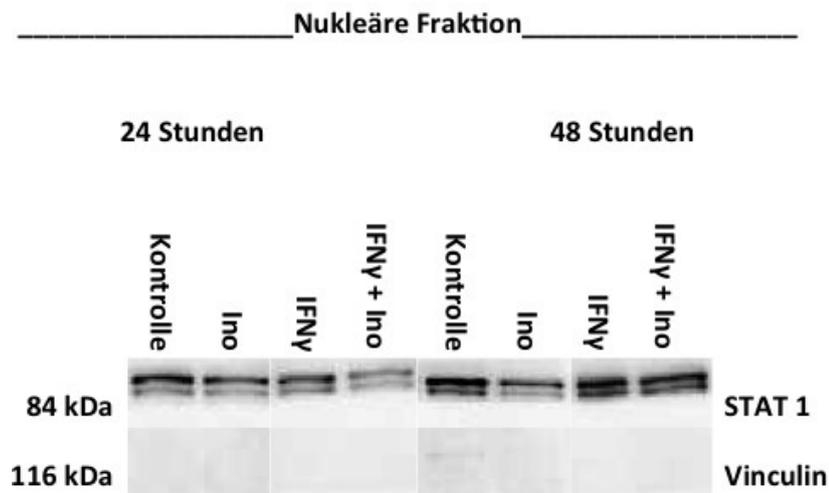
### 3.2.3 Untersuchungen zum Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Verteilung des Transkriptionsfaktors STAT1 im Zellkern

Um zu untersuchen, ob Inositol-C2-PAF möglicherweise einen Einfluss auf die Translokation des Transkriptionsfaktors STAT1 hat, wurde eine Kern-/Zytosol-Fraktionierung von den Zellen, die über 15min, 60min, 24h und 48h mit IFN $\gamma$  (10ng/ml) und 5 $\mu$ M Inositol-C2-PAF behandelt wurden, durchgeführt und mittels Western Blotting analysiert. Zur Überprüfung der Reinheit der Kern-/Zytosol-Trennung wurde die Kernfraktion auf Anwesenheit von Vinculin, einem zytosolischen Protein getestet. Der Kernmarker p300 ist in den Versuchen nicht mitgeführt worden, da andere Antikörper ausgetestet wurden, die auf der Höhe des Kernmarkers liefen. Ein Fehlen der Vinculinbande dient in diesem Fall als Kontrolle. In den Western Blot-Versuchen nach 15min und 60min lässt sich kein Unterschied in der Signalintensität durch die Stimulation mit Inositol-C2-PAF im Vergleich zu den Kontroll-Zellen erkennen. Es zeigt sich allerdings jeweils eine starke Abnahme der Expression des Transkriptionsfaktors STAT1 im Zellkern bereits nach Stimulation über 15min bzw. 60min durch Zugabe von IFN $\gamma$  (Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.28:** Die STAT1-Expression in der nukleären Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot-Versuch nach 15min und 60min. Die HaCaT-Zellen wurden mit IFN $\gamma$  (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) für 15min und 60min inkubiert. Vinculin dient als zytosolisches Protein dem Nachweis der Reinheit der nukleären Fraktion. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus n=2 Versuchen.

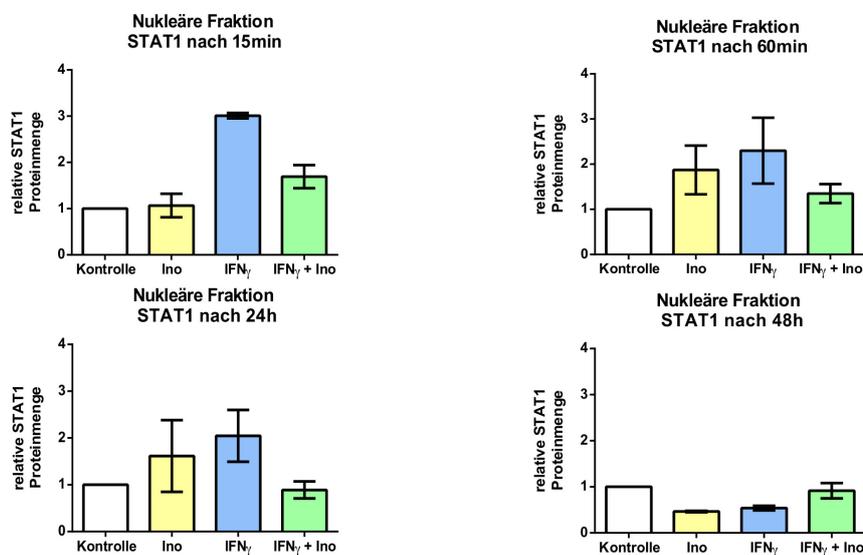
Nach 24h und 48h erkennt man bereits nur durch die Zugabe von Inositol-C2-PAF eine Abnahme der Expression im Zellkern im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Stimulation mit IFN $\gamma$  steigt diese wiederum an. Durch die gleichzeitige Gabe von IFN $\gamma$  und Inositol-C2-PAF kommt es hier erneut zu einer deutlich sichtbaren Abnahme der Expression nach 24h. Sie stellt sich allerdings, trotz erneuter Zugabe des Zytokins IFN $\gamma$  (10ng/ml) nach einer weiteren Stimulation über 24h nicht weiter dar (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29:** Die STAT1-Expression in der nukleären Fraktion in HaCaT-Zellen im Western Blot nach 24h und 48h. Die HaCaT-Zellen wurden mit IFN $\gamma$  (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (5 $\mu$ M) für 24h und 48h inkubiert. Vinculin dient als zytosolisches Protein dem Nachweis der Reinheit der nukleären Fraktion. Dargestellt ist ein repräsentiver Blot aus n=2 Versuchen.

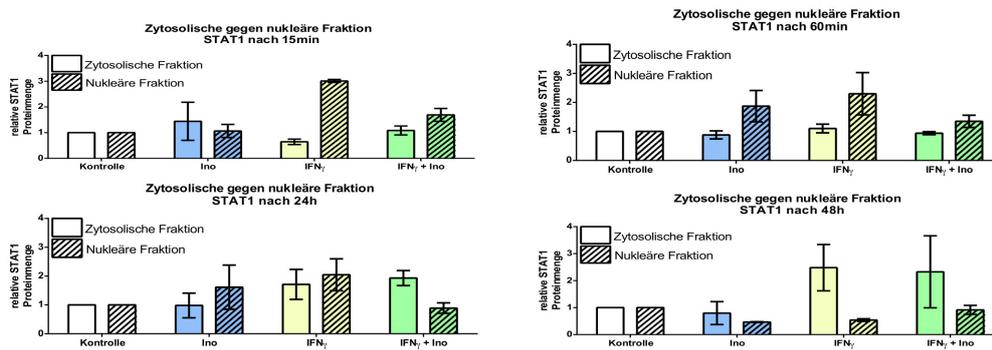
Die Quantifizierung der STAT1-Signale zeigt nach 15min Inkubation eine gleichbleibende relative Proteinmenge durch die Zugabe von Inositol-C2-PAF im Vergleich zur Kontrolle. Die alleinige Stimulation mit IFN $\gamma$  hebt diese deutlich an - von 1,0 auf 3,0. Durch die gleichzeitige Stimulation mit IFN $\gamma$  und Inositol-C2-PAF kommt es zu einer deutlichen Abnahme der relativen Proteinmenge des Transkriptionsfaktors STAT1 von 3,0 auf 1,8 - um fast 50%. Nach 60-minütiger Inkubation kommt es allerdings zu einem Anstieg der relativen Proteinmenge durch Behandlung mit Inositol-C2-PAF im Vergleich zur Kontrolle. Die Abnahme der Expression im Zellkern durch gleichzeitige Stimulation mit IFN $\gamma$  und Inositol-C2-PAF ist hier ebenfalls deutlich sichtbar. Die relative Proteinmenge fällt von 2,4 auf 1,5. Auch nach 24h erkennt man im Vergleich

zu den Kontroll-Zellen ein Anstieg der relativen Proteinmenge behandelt man die Zellen lediglich mit Inositol-C2-PAF. Behandelt man die Zellen nur mit IFN $\gamma$  wird dieser Anstieg noch deutlicher- die relative Proteinmenge steigt von 1 auf 2,5. Nach Stimulation mit IFN $\gamma$  und Inositol-C2-PAF ist der Abfall der Expression im Zellkern besonders stark, um mehr als 50% - von 2,1 relativer Proteinmenge auf unter 1,0. Nach 48h kommt es trotz erneuter Zugabe von IFN $\gamma$  (10ng/ml) nach den ersten 24h zu einer minimalen Zunahme der Expression im Zellkern des Transkriptionsfaktors von 0,5 relativer Proteinmenge auf 0,9 (Abbildung 3.30).



**Abbildung 3.30:** Quantifizierung der Western Blot-Versuche zum Nachweis der STAT1-Expression in der nukleären Fraktion nach 15min, 60min, 24h und 48h (n=2 Versuche).

Trägt man die relative Proteinmenge des Zytosols im direkten Vergleich zum Zellkern auf, so zeigt sich bei der Stimulation über 15min durch Zugabe von IFN $\gamma$  eine beim Zellkern sehr starke Zunahme der relativen Proteinmenge des Transkriptionsfaktors STAT1, die allerdings durch die gleichzeitige Zugabe von Inositol-C2-PAF stark reduziert wird. Einen ähnlich starken Effekt sieht man ebenfalls bei der Stimulation über 60min. Im Verlauf der Stimulation über 24h nimmt der Effekt etwas ab (Abbildung 3.31) und ist nach 48h kaum noch sichtbar.



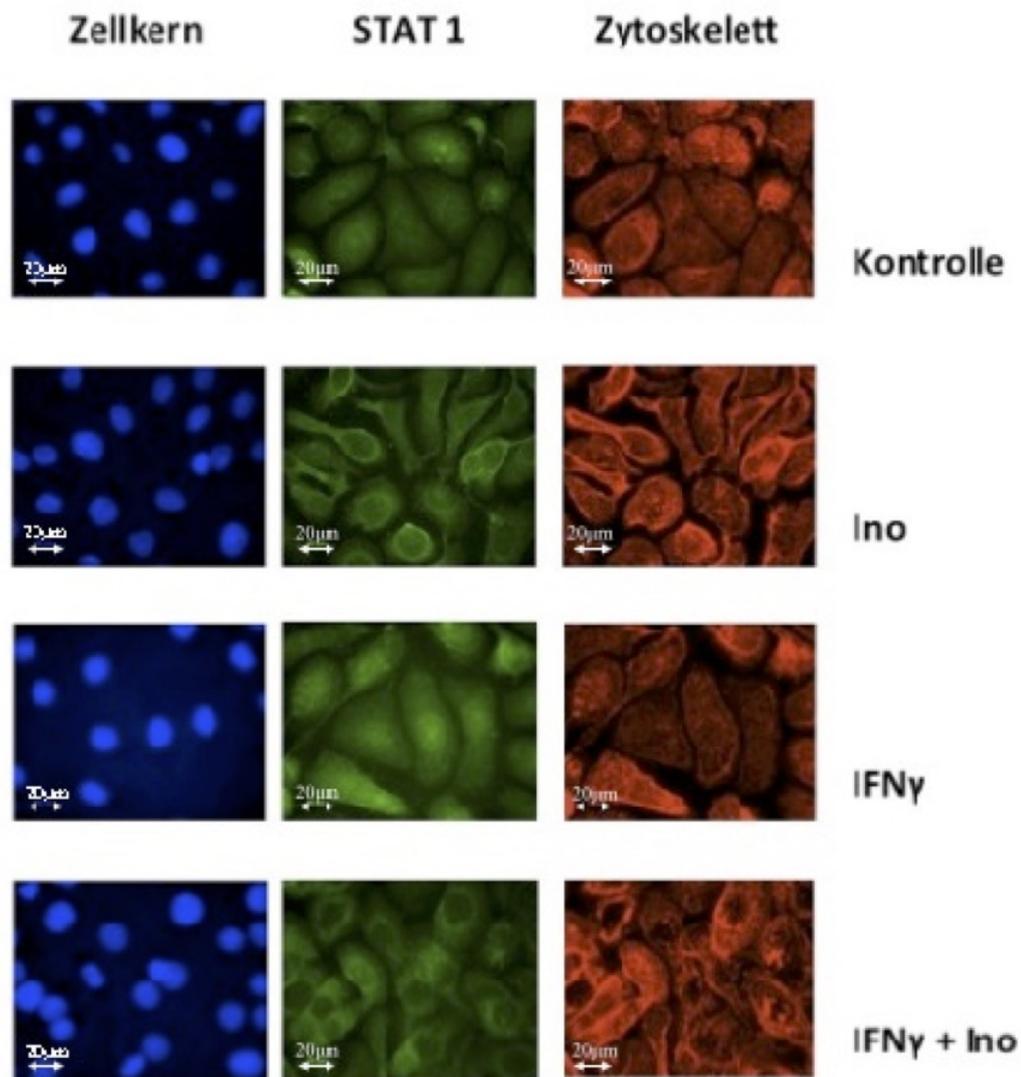
**Abbildung 3.31:** Die quantifizierte zytosolische und nukleäre Fraktion der STAT1-Expression der Western Blot- Versuche nach 15min, 60min, 24h und 48h (n= 2 Versuche).

### 3.2.4 Der Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors STAT1 mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse

Für die Immunfluoreszenz-Analyse wurden die humanen Keratinozyten im subkonfluenten Zustand analysiert. Die Konzentration von Inositol-C2-PAF wurde mit  $2,5\mu\text{M}$  etwas niedriger gewählt, da nach Austestung zu viele Zellen nach 24h auf dem Objektträger verstarben. Die IFN $\gamma$ -Konzentration wurde bei  $10\text{ng/ml}$  belassen, da in den Western Blot-Versuchen hier bereits Effekte auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors STAT1 innerhalb der Zelle sichtbar wurden.

Abbildung 3.32 zeigt die Lokalisation des Transkriptionsfaktors STAT1 (grün) innerhalb der Zelle nach Stimulation über 24h.

Die blaue Färbung zeigt den Zellkern und die rote Färbung stellt das F-Aktin-Zytoskelett dar. Während unter Kontrollbedingungen STAT1 gleichmäßig innerhalb der gesamten Zelle verteilt ist, ist STAT1 in Inositol-C2-PAF-behandelten Zellen nur außerhalb des Zellkerns zu beobachten. Die Stimulation mit IFN $\gamma$  verstärkt wiederum die Kernlokalisierung von STAT1. Die gleichzeitige Behandlung mit Inositol-C2-PAF reduziert die Lokalisation von STAT1 im Zellkern. Die Struktur des Zellkerns und des F-Aktin-Zytoskeletts sind nach den jeweiligen Behandlungen unverändert.



**Abbildung 3.32:** Die Expression von STAT1 in HaCaT-Zellen im indirekten Immunfluoreszenz-Versuch nach 24h. Die Zellen wurden mit IFN $\gamma$  (10ng/ml) und in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (2,5 $\mu$ M) für 24h inkubiert. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus n=3 Versuchen.

## 4 Diskussion

Die *Psoriasis vulgaris* ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut, die mehr als 2% der deutschen Bevölkerung betrifft (Augustin et al. (2010)) und die bis heute als nicht heilbar gilt. Das oftmals schwere klinische Bild mit geröteten und stark schuppenden Entzündungsherden an den für die *Psoriasis vulgaris* typischen Prädispositionsstellen führen oftmals zu einem hohen Leidensdruck der Patienten. Das erhöht wiederum den Druck und das wirtschaftliche Interesse, weiter nach alternativen Behandlungsoptionen zu forschen. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Phospholipidanalogs Inositol-C2-PAF auf Signalmoleküle, die in verschiedenen Studien für den Krankheitsverlauf der *Psoriasis vulgaris* als wichtige Zielstrukturen beschrieben wurden, untersucht werden. Hierzu gehören der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, sein Regulatormolekül I $\kappa$ B $\alpha$  und dessen phosphorylierte Form pI $\kappa$ B $\alpha$ . Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang der Transkriptionsfaktor STAT1 untersucht. In Vorarbeiten konnte mithilfe Genom-weiter Mikroarray-Analysen gezeigt werden, dass das synthetische Phospholipid einen Einfluss auf die mRNA-Expression NF $\kappa$ B-abhängiger Gene hat und die Expression von STAT1 inhibiert (Semini et al. (2011b, 2014a)). Als Modellsysteme für die durchgeführten Untersuchungen dienten humane entzündliche 2D-Zellkultursysteme, die aus immortalisierten humanen Keratinozyten aufgebaut wurden.

## 4.1 Die Western Blot-Methode als Nachweismethode zur Beurteilung der Wirkung von Inositol-C2-PAF in humanen Keratinozyten

Bereits im Jahre 1979 wurde das Immunoblotting, mit dem Transfer von Proteinen aus einem Gel auf die Nitrozellulosemembran, durch Towbin und seinen Mitarbeitern entwickelt (Towbin et al. (1979)) und wird bis heute als Standardmethode in der Diagnostik und Forschung angewandt. Die Western-Blot-Methode hat den Vorteil, dass durch die vorgeschaltete Gel-Elektrophorese eine Trennung des Proteingemisches nach Größe, Ladung und/oder Konformation erfolgt. So lassen sich ganz bestimmte relevante Proteine detektieren, die sich mithilfe eines zusätzlich aufgetragenen Proteinmarkers, der ebenfalls aufgetrennt wird und dadurch die genaue Zuordnung ermöglicht, ermitteln lassen. Das Übertragen der aufgetrennten Proteine während des Blotting auf eine Nitrozellulosemembran stellt einen weiteren Vorteil dar, da man das Ergebnis auf einer festen gut zu verarbeiteten Unterlage hat. Zudem kann man parallel dazu eine Semi-quantifizierung vornehmen. Im Vergleich zu einer mitgeführten Ladekontrolle, läßt sich die Stärke der Banden auf der Membran untereinander vergleichen. Zusammen mit der doch hohen Empfindlichkeit und Spezifität erhielt die Methode in dieser Arbeit zum Nachweis der obergenannten Proteine, nach einer ausführlichen Einarbeitung durch erfahrenes Laborpersonal, zu Beginn der Versuche einen sehr hohen Stellenwert. Im Verlauf der Durchführungen zeigten sich leider große Schwankungen in den Ergebnissen der einzelnen Experimente im Vergleich. Das spiegelte sich zudem an den hohen Fehlerbalken der Ergebnisse wider und minimierte damit die hohe Sensitivität des Tests.

## 4.2 Die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf humane Keratinozyten *in vitro*

Inositol-C2-PAF, ein glykosidiertes Phospholipid und ein Vertreter der Alkylphospholipide, zeigt einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von humanen Keratinozyten *in vitro* (Mickeleit et al. (1995, 1998)). Es wirkt sehr effizient

bei geringer Zytotoxizität (Fischer et al. (2006)). Dabei steigert es die terminale Differenzierung und hemmt gleichzeitig die Motilität der Keratinozyten (Fischer et al. (2006), Semini et al. (2011a)). Im Gegensatz zu den konventionellen Zytostatika schädigen derartige Moleküle nicht die DNA sondern interkalieren und akkumulieren in der Zellmembran (Eibl (1990)) und führen damit zu Veränderungen in der Membranfluidität und zur Störung von Signalkaskaden Jiménez-López et al. (2002), Berkovic et al. (2002). Das wiederum beeinflusst die Bildung und die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Gajate (2002), Mollinedo et al. (2004)). Eine Vielzahl anderer Arbeiten zeigt, dass synthetische Phospholipide, wie Edelfosin® und Miltefosin® den MAP-Kinase und PI3K-/Akt-Weg inhibieren können (Zhou et al. (1996), Gajate et al. (1998), Ruiter et al. (1999, 2001, 2003), Samadder et al. (2004)). Für das synthetische Phospholipid Inositol-C2-PAF konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass es die Transkription von Genen inhibiert, die im Zusammenhang mit der angeborenen und adaptiven Immunantwort stehen und an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Vieler dieser durch Inositol-C2-PAF reduzierten Transkripte sind maßgeblich an der Entstehung chronisch entzündlicher Hauterkrankungen, wie der *Psoriasis vulgaris* beteiligt (Semini et al. (2011a)). Dazu gehören unter anderem Chemokine und Zytokine, wie CCL2 und IL-6, antimikrobielle Peptide, wie S100, A7, A8 und A9 und MHC-Moleküle (Semini et al. (2011b, 2014a)). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors STAT3 leicht herunterreguliert wird, dessen Phosphorylierung aber signifikant durch Inositol-C2-PAF reduziert wird (Stricker (2019)). Aufgrund seiner Rolle als sogenannter Biological-Response-Modifier (Semini et al. (2014a)) sollte der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf weitere entzündungsrelevante Signalkaskaden und damit auf die schon oben genannten NFκB- und STAT1-Signalwege ausgeweitet werden. Beide spielen ebenfalls eine tragende Rolle am Erhalt des Krankheitsgeschehens der *Psoriasis vulgaris* (van der Fits et al. (2004), Eriksen et al. (2005), Rácz et al. (2011), Goldminz et al. (2013), Moorchung et al. (2013)).

### 4.3 Die Wirkung von IL-6 und Inositol-C2-PAF auf die Aktivität von NFκB p50/p105 in humanen Keratinozyten

Bevor die Versuche durchgeführt wurden, wurde die Wirkung der Zytokine TNFα, IL-1β, OSM und IL-6 in der Konzentration von 10ng/ml in Bezug auf die Proteinexpression von NFκB p105/p50 in humanen Keratinozyten mithilfe der Western Blot-Analyse ausgetestet. Dabei stellte sich heraus, dass IL-6, im Vergleich zu den anderen getesteten Zytokinen einen minimal stärkeren Einfluss auf die Expression der p105- bzw. p50- Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB hat. Dieser Effekt war unerwartet, da das Zytokin IL-6, anders als TNFα, nicht zu den klassischen NFκB-aktivierenden Zytokinen zählt. Insgesamt findet man zu diesem Thema nur wenige Arbeiten. Dieses Ergebnis korreliert jedoch mit einer Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass IL-6 in intestinalen Epithelien den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert. Diese Daten weisen darauf hin, dass IL-6 nicht nur durch die aktivierte Gentranskription des Transkriptionsfaktor NFκB im Zellkern vermehrt gebildet wird (Wang et al. (2003)), sondern umgekehrt auch in der Lage ist NFκB zu aktivieren. Möglicherweise müssen TNFα und IL-1β in diesem *in vitro* Testsystem in höheren Konzentrationen im Vergleich zu IL-6 eingesetzt werden, um den Transkriptionsfaktor NFκB p105/p50 zu aktivieren. Neben den genannten, gibt es knapp 200 weitere beschriebene Faktoren (Pahl (1999), Harden et al. (2015)), die wichtige Hauptakteure bei der Expression und der Aktivierung des kanonischen NFκB-Weges darstellen, die möglicherweise noch deutlichere Aktivierungssignale in Bezug auf den NFκB-Weg gegeben hätten. Die Wahl fiel dennoch auf IL-6, um dem oben beschriebenen Effekt detaillierter nachzugehen. Um den Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Transkriptionsfaktor NFκB p105/p50 in humanen Keratinozyten zu untersuchen, wurde durch die genannte Stimulation mit IL-6 *in vitro* ein Entzündungsgeschehen innerhalb der Zelle simuliert und mittels Western Blotting sowie der Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. In dem Versuch der Kurzzeitstimulation mit der NFκB-Untereinheit p105 zeigt sich bereits nach 15min eine vermehrte Expression durch die Stimulation mit IL-6. Diese klingt allerdings nach 24h bzw. 48h ab und ist dann nicht mehr nachweisbar. Die Untersuchung der NFκB p50-Untereinheit zeigt ein umgekehrtes Bild. Hier hat die Stimulation mit IL-6 über 15min und 60min keinen Einfluss auf die Expression von NFκB p50, aber nach einer

Stimulation über 24h und 48h kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Signalintensität. In den jeweiligen Fraktionierungen von Zytosol und Zellkern zeigt sich wiederum ein ganz anderes Ergebnis mit einem Anstieg in der zytosolischen Fraktion von NFκB p105 nach 24h und einer gleichbleibenden Proteinmenge in der zytosolischen und nukleären Fraktion der NFκB p50-Untereinheit nach einer Stimulation über 24h. Diese Ergebnisse sind schwer zu interpretieren, da mögliche Erklärungsansätze für diese Ergebnisse in der Literatur schwer zu finden sind. Wie oben bereits erwähnt zählt IL-6 nicht zu den Hauptakteuren in der Aktivierung von NFκB. Dennoch kann allgemein festgestellt werden, dass durch die Stimulation mit IL-6 initial aus dem Vorläuferprotein NFκB p105/p50, die aktive, zur DNA-Bindung befähigten Form p50 entsteht. Daher müssten nach der Kurzzeitstimulation innerhalb der Zelle eine verminderte Proteinmenge von p105 und eine erhöhte Proteinmenge p50, zu finden sein. Da das p50 als aktive Komponente in den Kern transloziert und dort wie bereits erwähnt an die DNA bindet, müsste es auch dort vermehrt zu finden sein. Für die Ergebnisse der längeren Stimulationszeiten über 24h und 48h in den einfachen Solubilisaten und den Fraktionierungen von Zytosol und Zellkern könnte die Halbwertszeit des Zytokins IL-6 eine mögliche Erklärung darstellen. Diese liegt bei wenigen Sekunden bis Minuten. Daher wurden die Zellen in der Langzeitstimulation über 48h, nach Ablauf der ersten 24h erneut mit IL-6 10ng/ml stimuliert. Dennoch kann man davon ausgehen, dass die Wirkung des Zytokins gerade in den Versuchen der Langzeitstimulation über 24h und 48h, trotz der erneuten Stimulation nach 24h, eventuell nicht ausreichend über den gesamten Stimulationszeitraum war und man eindeutigere Ergebnisse durch Verkürzung der Stimulationszeiten erhalten hätte. NFκB ist als Transkriptionsfaktor maßgeblich an der Transkription proinflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Enzyme und immunologischer Rezeptoren beteiligt und damit einer der wichtigsten Regulatoren von Entzündungs-, Apoptose- und Differenzierungsprozessen (Duh et al. (1989), Kaltschmidt et al. (1993), Pahl (1999), Ahn (2005), Gupta et al. (2010a,b)). Die Studien von (Lowe et al. (2007)) und (Goldminz et al. (2013)) zeigen eine Korrelation zwischen der Aktivierung von NFκB und dem Ausbruch der *Psoriasis vulgaris*. Auch andere Autoimmunerkrankungen, wie chronische Darmerkrankungen (Ardite et al. (1998)) und der autoimmunen Enzephalomyelitis (Kaltschmidt et al. (1994)) zeigen ebenfalls eine Beteiligung von NFκB an deren Pathogenese. Bei Erkrankungen wie Asthma (Barnes (1996)), rheuma-

toider Arthritis (Asahara et al. (1995)) und Multipler Sklerose (Gveric et al. (1998), Bonetti et al. (1999)) gibt es ebenfalls Hinweise auf die Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors. Diese Beobachtungen, konnten bereits für erste therapeutische Ansätze benutzt werden (Verma (2004), Goldminz et al. (2013)), indem die unterschiedlichsten NF $\kappa$ B-spezifischen Signalkaskaden blockiert werden können (Verma (2004), Kumar et al. (2004)). Dabei stellen folgende Angriffspunkte in der NF $\kappa$ B-Signalkaskade eine Therapieoption dar (Verma (2004), Kumar et al. (2004)):

1. Inhibition der IKK-Aktivität
2. Stabilisierung der I $\kappa$ B-Proteine durch Proteasomblockade
3. Blockade der nukleären Translokation der NF $\kappa$ B-Dimere
4. Direkte Inhibition der DNA- Bindungsaktivität

Viele Arbeiten haben sich bereits mit der Austestung verschiedenster Wirkstoffe/Inhibitoren auf die NF $\kappa$ B-Signalkaskade beschäftigt. So konnte bereits die Inhibition von NF $\kappa$ B durch Benzothiophen-2-yl-3-bromo-5-hydroxy-5-Hydrofuran-2-one (BTH), als Therapieoption in der Behandlung der Psoriasis *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden (Andrés et al. (2013a)). BTH ist in der Lage die Freisetzung wichtiger Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-8 und IL-6), die für den Erhalt und Ausbruch der *Psoriasis vulgaris* von entscheidender Bedeutung sind, zu inhibieren und führt damit zu einer verminderten Aktivität von NF $\kappa$ B (Andrés et al. (2013a)). Auch Chondroitinsulfat, ein Vertreter der natürlichen Glykosaminoglykane, konnte die NF $\kappa$ B-Aktivierung *in vitro* durch eine verminderte Freisetzung der oben genannten Zytokine unterbinden (Andrés et al. (2013b)). Thiosalicylate zeigen ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die NF $\kappa$ B Aktivierung in psoriatischer Haut in Tiermodellen. Anders als BTH und Chondroitinsulfat verhindern sie die Bindung von NF $\kappa$ B an die DNA (Amigó et al. (2007)). Neben der angesprochenen direkten NF $\kappa$ B-Blockade stellt auch die indirekte Blockade von NF $\kappa$ B eine erfolgversprechende Alternative dar. Durch erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentrationen kommt es zu einer Steigerung der NF $\kappa$ B-Aktivität. Dementsprechend verbessert die TNF $\alpha$ -Blockade in der Behandlung der *Psoriasis vulgaris* (Lizzul et al. (2005), Gottlieb et al. (2005)) das entzündliche Erscheinungsbild der Haut und reduziert die gesteigerte proliferative Aktivität und ausgeprägte Verhornung durch die gestörte Ausreifung der Keratinozyten. In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden,

ob das Phospholipidanalogen Inositol-C2-PAF, welches auch anti-inflammatorisches Potential besitzt (Semini et al. (2014a)) und in zwei komplementären Mausmodellen psoriatische Symptome stark reduziert (Forkel et al. (2014)), seine Wirkung ebenfalls über den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B entfaltet, da in Genom-weiten Analysen gezeigt werden konnte, dass durch das synthetische Phospholipid NF $\kappa$ B-abhängige Gene herunterreguliert werden (Semini et al. (2011a, 2014a)). Dabei wurde sich auf die Expression der p105-Untereinheit beschränkt, die durch proteosomalen Abbau in die p50-Untereinheit überführt wird. Weder in den einfachen Solubilisaten noch aus Kern- und Zytosol-Fractionen ist ein Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B p105/p50 mittels Western Blot-Analyse identifizierbar. Auch in der Immunfluoreszenz-Analyse, die als zweite Methode herangezogen wurde, ließ sich kein klarer Effekt auf die Lokalisation von NF $\kappa$ B p105/p50 innerhalb der Zelle zeigen. Sie stützen somit die Ergebnisse der Western Blot-Versuche. Demnach wurden keine weiteren Versuche im Anschluss durchgeführt, um den möglichen Angriffspunkt von Inositol-C2-PAF am NF $\kappa$ B zu ermitteln. Für validere Ergebnisse und auch für das Berechnen statistischer Werte müssten die Versuche häufiger, mindestens aber dreimal, durchgeführt werden. Zudem hätten auch die anderen möglichen Untereinheiten von NF $\kappa$ B zur Austestung kommen müssen, um eine eindeutige Aussage über die Wirkung von Inositol-C2-PAF innerhalb der Signalkaskade des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B treffen zu können. Ein Grund für die fehlende oder eventuell nicht sichtbare Wirkung könnte sein, das Inositol-C2-PAF an einer anderen Stelle innerhalb der Signalkaskade von NF $\kappa$ B angreift. Dafür hätte der Nachweis eines Endproduktes bzw. eines von NF $\kappa$ B transkribierten Proteins erfolgen müssen. Da die Immunantwort einen fein abgestimmten und komplex regulierten Prozess darstellt, sollten neben der Betrachtung der einzelnen Transkriptionsfaktoren auch die Interaktionsmöglichkeiten der Signaltransduktionskaskaden diskutiert werden. So kann es in Tumorzellen zu einem Zusammenspiel zwischen den Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und STAT3 kommen. Durch die physiologische Interaktion zwischen Rel A, eines der Mitglieder der NF $\kappa$ B-Familie, und STAT3 kommt es zu einer modifizierten Transkriptionsaktivität der eben genannten (Yu et al. (2002), Lee et al. (2009)). Zudem führt die Aktivierung beider Signalkaskaden zu einer gesteigerten Expression von Zytokinen, wie IL-6. Dieses kann wiederum über Feedback-Mechanismen zu einer Interaktion auf die Aktivierung von NF $\kappa$ B und STAT3 führen (Grivennikov (2008, 2010)). Die Wirkung von Inositol-C2-

PAF wäre in diesem Fall womöglich nicht stark genug gewesen. Dies kann im Rahmen der vorgestellten Analysen durchaus eingetreten sein. Detailliertere Untersuchungen, in denen zusätzlich spezifische Inhibitoren eingesetzt werden, die die angesprochene Interaktion verhindern, würden hier weiteren Aufschluss geben. Zudem kann NF $\kappa$ B seine eigene Transkription regulieren und steigern. Liegt bereits aktives NF $\kappa$ B im Zellkern vor, so wird die Transkriptionsrate der Gene für die Proteine c-Rel, Rel B und p105, nicht aber die von p65, deutlich erhöht (Ueberla et al. (1993)). Es konnte gezeigt werden, dass sich in den Promotoren dieser Gene NF $\kappa$ B-Bindungsstellen befinden (Ruben et al. (1991), Ryseck et al. (1992), Ten et al. (1992)). Das Gleiche gilt für das I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen (Sun et al. (1993)). Demnach könnte eine positive Wirkung von Inositol-C2-PAF durch eine gesteigerte Autoregulation von NF $\kappa$ B ebenfalls nicht nachweisbar sein. Auch wenn Inositol-C2-PAF eine positive Wirkung auf NF $\kappa$ B gehabt hätte, gilt es zu hinterfragen, ob die gezielte NF $\kappa$ B-Blockade als langfristige Therapie generell einen therapeutischen Mehrwert mit sich bringt, da der Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B eine zentrale Rolle sowohl in entzündlichen und apoptotischen Prozessen als auch bei Differenzierungsvorgängen inne hat. Es konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass es generell durch Blockade von NF $\kappa$ B zu schweren teratogenen Erkrankungen und es zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber opportunistischen Infektionen kommt (Lavon et al. (2000)). Trotz der Hinweise auf viele Nebenwirkungen, die die Blockade von NF $\kappa$ B mit sich bringen könnte, eröffnet diese Behandlungsform dennoch neue therapeutische Möglichkeiten.

#### 4.4 Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Lokalisation von I $\kappa$ B $\alpha$ und pI $\kappa$ B $\alpha$ in humanen Keratinozyten

I $\kappa$ B $\alpha$  liegt innerhalb der Zelle gebunden an NF $\kappa$ B vor und hält es so bis zu seiner Aktivierung im inaktiven Zustand. Äußere Stimuli führen dazu, dass das an NF $\kappa$ B gebundene I $\kappa$ B $\alpha$  an Ser32 und Ser36 und das I $\kappa$ B $\beta$  an Ser19 und Ser23 polyubiquitinyliert und durch das 26S-Proteasom degradiert wird (Beg (1993), Courtois (2000)). Gleichzeitig mit der damit verbundenen Aktivierung von NF $\kappa$ B setzt mit zeitlicher Verzögerung zudem die NF $\kappa$ B-abhängige Neusynthese von I $\kappa$ B $\alpha$  ein, das in den Zellkern wandert. Das aktive NF $\kappa$ B wird von der DNA gelöst und gebunden an I $\kappa$ B $\alpha$  in das Zytoplas-

ma zurücktransportiert (Arenzana-Seisdedos et al. (1995), Ghosh (2008)). Dadurch wird ein Überschießen der Reaktion verhindert und man spricht von einer negativen Feedback-Hemmung. Die NF $\kappa$ B-/I $\kappa$ B-Reakkumulation, ebenso wie die  $\kappa$ B-abhängige Transkription von NF $\kappa$ B-Proteinen führt zur Bildung induzierbarer Komplexe, die nach erneuter Stimulation aktiviert werden können. C-Rel-haltige Domänen sind dabei weniger anfällig für den nachträglichen Angriff durch I $\kappa$ B $\alpha$ . Zudem beeinflussen sie die I $\kappa$ B $\alpha$ -Neusynthese negativ (Baeuerle (1994)). Durch die gleichzeitige Stimulation mit IL-6 und Inositol-C2-PAF über 24h ließ sich signifikant beobachten, dass vermehrt I $\kappa$ B $\alpha$  innerhalb der Zelle nachweisbar ist, im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IL-6 und zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Über 48h ist die vermehrte Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  sogar hochsignifikant mit  $p < 0,01$  auch wieder im Vergleich zur Kontrolle. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, das Inositol-C2-PAF nicht direkt die Freisetzung von NF $\kappa$ B hemmt, sondern indirekt über die vermehrte Bildung von I $\kappa$ B $\alpha$  wirkt, das den aktivierten Transkriptionsfaktor wie oben beschrieben von der DNA löst und in das Zytoplasma zurücktransportiert oder die Vermutung aufkommen, dass das vermehrt gebildete I $\kappa$ B $\alpha$  den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B in seinem inaktiven Zustand hält. Gleichzeitig kommt es allerdings auch zu einer vermehrten Bildung von phosphoryliertem I $\kappa$ B $\alpha$  in der Zelle, das dadurch auf den Abbau vorbereitet wird und aktiviertes NF $\kappa$ B freisetzt. Die phosphorylierte Form von I $\kappa$ B $\alpha$  ist innerhalb der Zelle nur kurzzeitig stabil und somit kaum bzw. nur kurz nachweisbar. Zur genauen Bestimmung von pI $\kappa$ B $\alpha$  hätte man einen Proteasominhibitor hinzufügen müssen z.B. MG 132. Damit hätte der Abbau im Proteasom von I $\kappa$ B $\alpha$  unterbunden werden können. Auch die Stimulationszeiten hätten dafür wesentlich kürzer gewählt werden müssen als 24h. Demnach entspricht das gezeigte Ergebnis des Phosphorylierungszustands von I $\kappa$ B $\alpha$  der Stimulation über 24h nur noch einem Bruchteil von dem zu erwartendem Ergebnis der eigentlich durchzuführenden Kurzzeitstimulation. Um den Einfluss von IL-6 auf die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  eingehender darzustellen, und auch für das Berechnen statistischer Werte, müssten die Versuche erneut, also insgesamt mindestens dreimal, durchgeführt werden. Das zeitliche Intervall war dafür allerdings insgesamt zu kurz gewählt.

## 4.5 Der Einfluss von IFN $\gamma$ und Inositol-C2-PAF auf STAT1 in humanen Keratinozyten im Western Blot-Versuch und der Immunfluoreszenz-Analyse

Die *Psoriasis vulgaris* ist, wie andere chronisch entzündliche Hauterkrankungen, gekennzeichnet durch ein Infiltrat aktivierter T-Lymphozyten, die durch die Freisetzung von Botenstoffen in der Lage sind die Immunfunktion residierender Hautzellen zu beeinflussen (Bos (1999), Cavani et al. (2001), Girolomoni et al. (2001)).

Da IFN $\gamma$  weitgehend nur durch T-Zellen und natürliche Killerzellen gebildet wird, stellt es einen der stärksten Aktivatoren proinflammatorischer Funktionen in Keratinozyten dar. Diese bilden dann durch die IFN $\gamma$ -Stimulation wiederum eine Vielzahl von Chemo- und Zytokinen und können so die unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen in der Haut steuern (Albanesi et al. (1999, 2000, 2001)).

Diese oben beschriebene Wechselwirkung ist einer der Hauptgründe für die Verstärkung der Hautentzündung während immunvermittelter Hauterkrankungen. Ein weiterer

Grund für den Einsatz von IFN $\gamma$  in den gemachten Tests ist, dass IFN $\gamma$  neben den interleukinartigen Zytokinen, wie IL-6, IL-11 und OSM zu den Hauptaktivatoren des JAK-STAT-Signalweges gehört (Igarashi et al. (1994), Sakatsume et al. (1995)). Über den JAK-STAT-Signalweg ist der Transkriptionsfaktor STAT1 an der Regulation der Zellentwicklung, Wachstumskontrolle und der Homöostase beteiligt und spielt neben NF $\kappa$ B ebenfalls eine große Rolle in der Erhaltung der Psoriasis (Hald et al. (2013)).

IFN $\gamma$ -Signale aktivieren über spezifische membranständige Rezeptoren rezeptorassoziierte intrazelluläre Janus-Kinasen, die wiederum spezifische Tyrosinreste des Rezeptors phosphorylieren können. Die STAT1-Monomere können daraufhin an ihrer SH-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrezeptor binden und werden ebenfalls durch die Janus-Kinasen phosphoryliert und es kommt zur Dimerisierung zweier pSTAT-Moleküle. Durch die Bildung des Dimers kommt es zur Ausbildung eines nukleären Lokalisationssignals (NLS), welches unmittelbar zur Translokation des Dimers in den Zellkern führt und dort gezielt die Genexpression initiiert. Über eine spezifische DNA-Bindungsdomäne erkennen die meisten Dimere ein etwa 8-10 basenpaarlanges DNA-Element und erhöhen so ihre Transkriptionsrate (Decker et al. (1991), Darnell (1997)),

Leonard (2001)). In der vorliegenden Arbeit ging es darum den Einfluss des Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die STAT1-Expression und -Lokalisation zu untersuchen. Generell konnte in Vorarbeiten bereits eine Wirkung des Phospholipids auf Mitglieder der STAT-Familie beschrieben werden. So wird die mRNA-Expression von STAT1 durch Inositol-C2-PAF gehemmt (Semini et al. (2011a, 2014a)). Die Expression des Verwandten STAT3 wird nur geringfügig reduziert, allerdings ist hier eine signifikante Hemmung der Phosphorylierung durch Inositol-C2-PAF zu beobachten (Stricker (2019)). Aus den Solubilisaten ist nach keinem der untersuchten Zeitpunkte ein klarer Effekt auf die STAT1-Expression zu beobachten. Man sieht nach den längeren Inkubationszeiten lediglich eine Erhöhung der STAT1-Expression durch  $\text{IFN}\gamma$ , was nach oben erwähnter Literatur auch durchaus plausibel ist. Inositol-C2-PAF hat in diesen Experimenten keinen Einfluss auf die Expression. Dies steht im Widerspruch zu Daten, die in zwei unabhängigen Mikroarray-Analysen erhoben wurden und zeigten, dass die Menge der STAT1-mRNA um ca. 50% nach Inositol-C2-PAF-Inkubation reduziert wird (Semini et al. (2011a, 2014a)). Die Quantifizierung der Western Blots zeigt jedoch, dass alle Werte mit sehr hohen Fehlern behaftet sind, so dass für eindeutigere Ergebnisse und auch für das Berechnen statistischer Werte die Versuche in höherer Anzahl, aber mindestens dreimal, durchgeführt werden müssten. Um detaillierte Einblicke in die Wirkung von Inositol-C2-PAF zu bekommen, wurden zusätzlich biochemische Kern-/Zytosol-Fraktionierungen durchgeführt. Mithilfe dieses Verfahrens und dem anschließendem Nachweis von STAT1 im Western Blot zeigte sich, dass  $\text{IFN}\gamma$  die Expression von STAT1 nach 24h erhöht. Einen Effekt durch Inositol-C2-PAF auf die zytosolische STAT1-Fraktion ist in keinem der Ansätze zu beobachten. Betrachtet und quantifiziert man die nukleären Fraktionen, so ist schon nach 15min eine Erhöhung der STAT1-Menge im Kern durch  $\text{IFN}\gamma$  zu verzeichnen. Die gleichzeitige Behandlung mit Inositol-C2-PAF führt zu einer Reduktion der STAT1-Menge. In ansonsten unbehandelten Zellen hat Inositol-C2-PAF keinen Einfluss auf die STAT1-Menge im Kern. Nach 48h sind diese Effekte nicht mehr zu beobachten und lassen sich eventuell durch eine Degradation des Zytokins oder durch Dekompensationsreaktionen anderer Signalkaskaden erklären. Somit scheinen sowohl  $\text{IFN}\gamma$  als auch Inositol-C2-PAF sehr schnell auf die Translokation von STAT1 in den Zellkern zu wirken. Die Zellen müssen jedoch mindesten eine Stunde vorher mit Inositol-C2-PAF prä-inkubiert werden, damit die Substanz seine Wirkung entfalten kann. Dies hängt vermutlich damit zusammen,

dass das Phospholipid, das aufgrund seiner chemischen Struktur in die Plasmamembran eingebaut wird, dort in ausreichender Menge angereichert werden muss und dann erst Einfluss auf Signalkaskaden nehmen kann (Semini et al. (2011b)), wodurch nachgeschaltet die Expression von Genen, die das nachfolgende Entzündungsgeschehen in der Haut unterhalten, moduliert werden. Welche Signalmoleküle genau durch das Inositol-C2-PAF angegriffen werden, müsste in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Obwohl dieses Ergebnis aufgrund einer fehlenden Anzahl von Experimenten nicht als statistisch signifikant betrachtet werden kann, wird es doch durch eine zweite unabhängige Analyse, die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse, bestätigt. Hier zeigt sich klar, dass  $\text{IFN}\gamma$  die Lokalisation des Transkriptionsfaktors im Kern erhöht und die Inkubation mit Inositol-C2-PAF zu einer Anreicherung des Moleküls im Zytosol führt. Der JAK-STAT-Signalweg wird *in vivo* durch Interaktion mit anderen Proteinen auf unterschiedliche Weise beeinflusst. Zu nennen ist hier die Familie „*Suppressors of Cytokine Signaling*“, die sogenannten (SOCS). Sie stellen die bedeutsamsten negativ regulierenden Gegenspieler dar (Hilton (2004)). Diese können über eine SH2-Domäne aktivierte Zytokin-Rezeptoren erkennen und darüber die Phosphorylierung durch die Janus-Kinasen hemmen und so die Aktivierung von STAT-Proteinen unterbinden. Die SOCS werden selbst von den STAT-Zielgenen kodiert und damit durch die Aktivierung der STAT-Proteine in der Zelle transkribiert. Aufgrund dieses parallel ablaufenden Mechanismus spricht man von einer direkten negativen Rückkopplung für den JAK-STAT-Weg (Kile (2001), Krebs (2001)). Als zweite große Gruppe gehören die Proteine der „*protein inhibitor of activated STAT*“ (PIAS) zu den endogenen Inhibitoren. Dabei spielt vor allem das PIAS1 eine wichtige Rolle in der Blockierung von phosphorylierten STAT1. So kann dieses nicht mehr an der DNA binden und keine Transkription initiieren (Chung et al. (1997), Liu et al. (1998), Shuai (2000)). Da die STAT1-Expression und -Aktivität bei Psoriasis-Patienten besonders hoch ist (Hald et al. (2013)), stellt die Blockade der Proteine und Rezeptoren, die STAT1 aktivieren können einen neuen Ansatz in der Therapie der *Psoriasis vulgaris* dar. Es existieren bereits eine Vielzahl von Versuchen, über den Angriff verschiedener Inhibitoren von Proteinen des JAK-STAT-Signalwegs die Symptome der Psoriasis zu mildern. Ein großer Vorteil der JAK-Inhibitoren ist, dass sie neben der oralen oder topischen Anwendung ein einfaches Dosierungsregime aufweisen. Im Vergleich zu anderen Biologicals, die subkutan oder intravenös, wenn auch in größeren Abständen von Wochen bis Monaten, verab-

reicht werden, erleichtert das für viele Patienten den Alltag. Dem Patienten vereinfacht das den Umgang mit dem Medikament ohne zusätzliche Klinikaufenthalte. Der Einsatz topischer JAK1-/JAK2-Inhibitoren zeigt bisher gute Erfolge im Tiermodell in der Behandlung der Psoriasis (Mesa (2010), Fridman et al. (2011)). Und auch die orale Anwendung von JAK3-Inhibitoren hat eine ähnlich erfolgreiche Wirkung (Chang et al. (2009), West (2009)). Die JAK-Inhibitoren sind zwar selektiv, aber leider noch nicht spezifisch für jedes einzelne JAK, so dass es zu Überschneidungen in den Interaktionen zwischen den JAKs und STATs kommt. Diese benannten Interaktionen stellen einen Nachteil dar, da so mehrere immunologische Wege innerhalb des Signalweges beeinflusst werden. Ein weiterer Nachteil stellt zudem die Hemmung bestimmter Interleukine dar, wie zum Beispiel IL-2 und IL-10 die nicht primär proinflammatorisch wirken, sondern eher eine entzündungshemmende Rolle spielen. Man kann erkennen, dass die Wirkung der JAK-Inhibitoren noch nicht eindeutig geklärt ist und in weiteren Studien getestet werden sollten, um weitere Erkenntnisse über deren Wirkungsweise zu erhalten und durch Modifikationen eine höhere Spezifikation zu erlangen (Kontzias et al. (2012), Telliez et al. (2016), Chaplin (2017)).

**Zusammenfassung:** Die *Psoriasis vulgaris* ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut, die mehr als 2% der deutschen Bevölkerung betrifft (Augustin et al. (2010)) und die bis heute als nicht heilbar gilt. Das oftmals schwere klinische Bild mit geröteten und stark schuppenden Entzündungsherden, an den für die *Psoriasis vulgaris* typischen Prädilektionsstellen, führen oftmals zu einem hohen Leidensdruck der Patienten. Das erhöht wiederum den Druck und das wirtschaftliche Interesse, weiter nach alternativen Behandlungsoptionen zu forschen. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Phospholipidanalogs Inositol-C2-PAF auf Signalmoleküle, die in verschiedenen Studien für den Krankheitsverlauf der *Psoriasis vulgaris* als wichtige Zielstrukturen beschrieben wurden, untersucht werden. Hierzu gehören der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, sein Regulatormolekül I $\kappa$ B $\alpha$  und dessen phosphorylierte Form pI $\kappa$ B $\alpha$ . Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang der Transkriptionsfaktor STAT1 untersucht. Für das synthetische Phospholipid Inositol-C2-PAF konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass es die Transkription von Genen inhibiert, die im Zusammenhang mit der angeborenen und adaptiven Immunantwort stehen und an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Vieler dieser durch Inositol-C2-PAF reduzierten Transkripte sind maßgeblich an der Entstehung chronisch entzündlicher Hauterkrankungen, wie der *Psoriasis vulgaris* beteiligt (Semini et al. (2011a)). Eine signifikante Wirkung durch das Inositol-C2-PAF konnte für den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B p50/p105 nicht gezeigt werden. Vielversprechender sieht es da allerdings bei seinen Regulatormolekülen I $\kappa$ B $\alpha$  und pI $\kappa$ B $\alpha$  aus. Die signifikante Erhöhung von I $\kappa$ B $\alpha$  durch Inositol-C2-PAF könnte bedeuten, das Inositol-C2-PAF indirekt über diesen besagten Mechanismus den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B an seinen Aufgaben hindert. Auch auf den Transkriptionsfaktor STAT1 scheint Inositol-C2-PAF einen positiven Einfluss zu haben. Dieses zeigte sich sowohl im Western Blot-Versuch als auch in der Immunfluoreszenz. Die Ergebnisse stellen allerdings nur Tendenzen dar, da die Versuche nicht ausreichend oft wiederholt werden konnten. Trotz des nicht eindeutigen Nachweises kann man weiterhin davon ausgehen, das Inositol-C2-PAF als Wirkstoffkandidat für die Behandlung chronisch entzündlicher Hauterkrankungen, wie der Psoriasis in Betracht kommt.

# Literaturverzeichnis

- Adkins, D., Abidi, M., Brown, R., Khoury, H., Goodnough, L., Vij, R., Westervelt, P., and DiPersio, J. (2000). Resolution of psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: late complications of therapy. *Bone Marrow Transplantation*, 26(11):1239–1241.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F. J., and Gurney, A. L. (2002). Interleukin-23 promotes a distinct cd4 t cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3):1910–1914.
- Ahn, K. S. (2005). Transcription factor NF- $\kappa$ B: A sensor for smoke and stress signals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056(1):218–233.
- Albanesi, C., Cavani, A., and Girolomoni, G. (1999). IL-17 is produced by nickel-specific t lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162:494–502.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Sebastiani, S., Cavani, A., Federici, M., De Pità, O., Puddu, P., and Girolomoni, G. (2000). IL-4 enhances keratinocyte expression of CXCR3 agonistic chemokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165:1395–1402.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Sebastiani, S., Cavani, A., Federici, M., Sozzani, S., and Girolomoni, G. (2001). A cytokine-to-chemokine axis between t lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *Journal of leukocyte biology*, 70:617–623.
- Ali, F., Cueva, A., Vyas, J., Atwan, A., Salek, M., Finlay, A., and Piguet, V. (2016). A

- systematic review of the use of quality-of-life instruments in randomized controlled trials for psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 176(3):577–593.
- Allen, M. H., Ameen, H., Veal, C., Evans, J., Ramrakha-Jones, V., Marsland, A., Burden, A. D., Griffiths, C., Trembath, R. C., and Barker, J. N. N. (2005). The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(1):103–106.
- Amigó, M., Payá, M., De Rosa, S., and Terencio, M. C. (2007). Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of tnf-alpha generation and nf-kappab activation in mouse skin. *British journal of pharmacology*, 152:353–365.
- Andrés, R. M., Montesinos, M. C., Navalón, P., Payá, M., and Terencio, M. C. (2013a). NF- $\kappa$ b and STAT3 inhibition as a therapeutic strategy in psoriasis: In vitro and in vivo effects of BTH. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(10):2362–2371.
- Andrés, R. M., Payá, M., Montesinos, M. C., Ubeda, A., Navalón, P., Herrero, M., Vergés, J., and Terencio, M. C. (2013b). Potential antipsoriatic effect of chondroitin sulfate through inhibition of NF- $\kappa$ b and STAT3 in human keratinocytes. *Pharmacological Research*, 70(1):20–26.
- Ardite, E., Panés, J., Miranda, M., Salas, A., Elizalde, J. I., Sans, M., Arce, Y., Bordas, J. M., Fernández-Checa, J. C., and Piqué, J. M. (1998). Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappa b in patients with inflammatory bowel disease. *British journal of pharmacology*, 124:431–433.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelier, F., Thomas, D., and Hay, R. T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized i kappa b alpha negatively regulates dna-binding and transcriptional activities of nf-kappa b. *Molecular and cellular biology*, 15:2689–2696.
- Asahara, H., Asanuma, M., Ogawa, N., Nishibayashi, S., and Inoue, H. (1995). High dna-binding activity of transcription factor nf-kappa b in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Biochemistry and molecular biology international*, 37:827–832.

- Atwan, A., Piguet, V., Finlay, A., Francis, N., and Ingram, J. (2017). Dermatology life quality index (DLQI) as a psoriasis referral triage tool. *British Journal of Dermatology*, 177(4):e136–e137.
- Augustin, M., Reich, K., Glaeske, G., Schaefer, I., and Radtke, M. (2010). Comorbidity and age-related prevalence of psoriasis: Analysis of health insurance data in germany. *Acta Dermato Venereologica*, 90(2):147–151.
- Baeuerle, P. A. (1991). The inducible transcription activator nf-kappa b: regulation by distinct protein subunits. *Biochimica et biophysica acta*, 1072:63–80.
- Baeuerle, P. A.; Henkel, T. (1994). Function and activation of nf-kappa b in the immune system. *Annual review of immunology*, 12:141–179.
- Baker, B. S., Powles, A. V., Lambert, S., Valdimarsson, H., and Fry, L. (1988). A prospective study of the koebner reaction and t lymphocytes in uninvolved psoriatic skin. *Acta dermato-venereologica*, 68:430–434.
- Baldwin, A. S. (1996). THE NF- $\kappa$ B AND I $\kappa$ B PROTEINS: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 14(1):649–681.
- Baltimore, D. (2009). Discovering nf-kappab. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1:a000026.
- Barnes, P. J. (1996). Pathophysiology of asthma. *British journal of clinical pharmacology*, 42:3–10.
- Beg, A. A., Finco, T. S., Nantermet, P. V., and Baldwin, A. S. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of i kappa b alpha: a mechanism for nf-kappa b activation. *Molecular and cellular biology*, 13:3301–3310.
- Beg, A. A.; Baldwin, A. S. (1993). The i kappa b proteins: multifunctional regulators of rel/nf-kappa b transcription factors. *Genes & development*, 7:2064–2070.
- Berdel, W. E. (1991). Membrane-interactive lipids as experimental anticancer drugs. *British journal of cancer*, 64:208–211.

- Berg, J. M., Stryer, L., and Tymoczko, J. L. (2013). *Stryer Biochemie (German Edition)*. Springer Spektrum.
- Berkovic, D., Sievers, S., Haase, D., Fleer, E. A. M., and Binder, C. (2002). Effects of hexadecylphosphocholine on phosphatidylcholine and phosphatidylserine metabolism in human lymphoma cells. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 2:85–92.
- Betts, J. C.; Nabel, G. J. (1996). Differential regulation of nf-kappab2(p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Molecular and cellular biology*, 16:6363–6371.
- Bonetti, B., Stegagno, C., Cannella, B., Rizzuto, N., Moretto, G., and Raine, C. S. (1999). Activation of nf-kappab and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions. implications for oligodendrocyte pathology. *The American journal of pathology*, 155:1433–1438.
- Bos, J. D. (2007). Psoriasis, innate immunity, and gene pools. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(3):468–471.
- Bos, J. D.; De Rie, M. A. (1999). The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunology today*, 20:40–46.
- Boukamp, P. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3):761–771.
- Brockman, J. A., Scherer, D. C., McKinsey, T. A., Hall, S. M., Qi, X., Lee, W. Y., and Ballard, D. W. (1995). Coupling of a signal response domain in i kappa b alpha to multiple pathways for nf-kappa b activation. *Molecular and cellular biology*, 15:2809–2818.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1995). Control of i kappa b-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 267:1485–1488.
- Burdzy, K., Munder, P. G., Fischer, H., and Westphal, O. (1964). Increase in the phagocytosis of peritoneal macrophages by lysolecithin. *Zeitschrift fur Naturforschung*.

- Teil B, Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie und verwandte Gebiete*, 19:1118–1120.
- Cai, Y., Fleming, C., and Yan, J. (2012). New insights of t cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cellular & Molecular Immunology*, 9(4):302–309.
- Camargo, C. M. d. S., Brotas, A. M., Ramos-e Silva, M., and Carneiro, S. (2013). Isomorphic phenomenon of koebner: facts and controversies. *Clinics in dermatology*, 31:741–749.
- Capon, F., Trembath, R. C., and Barker, J. N. (2004). An update on the genetics of psoriasis. *Dermatologic Clinics*, 22(4):339–347.
- Cavani, A., Albanesi, C., Traidl, C., Sebastiani, S., and Girolomoni, G. (2001). Effector and regulatory t cells in allergic contact dermatitis. *Trends in immunology*, 22:118–120.
- Cesare, A. D., Meglio, P. D., and Nestle, F. O. (2009). The IL-23/th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(6):1339–1350.
- Chan, Edwin S. L.; Cronstein, B. N. (2013). Mechanisms of action of methotrexate. *Bulletin of the Hospital for Joint Disease (2013)*, 71 Suppl 1:S5–S8.
- Chang, B. Y., Zhao, F., He, X., Ren, H., Braselmann, S., Taylor, V., Wicks, J., Payan, D. G., Grossbard, E. B., Pine, P. R., and Bullard, D. C. (2009). JAK3 inhibition significantly attenuates psoriasiform skin inflammation in CD18 mutant PL/j mice. *The Journal of Immunology*, 183(3):2183–2192.
- Chang, J. C., Smith, L. R., Froning, K. J., Schwabe, B. J., Laxer, J. A., Caralli, L. L., Kurland, H. H., Karasek, M. A., Wilkinson, D. I., and Carlo, D. J. (1994). Cd8+ t cells in psoriatic lesions preferentially use t-cell receptor v beta 3 and/or v beta 13.1 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91:9282–9286.
- Chaplin, S. (2017). Janus kinase inhibitors for autoimmune disorders. *Prescriber*, 28(12):33–37.

- Chen, F. E., Huang, D.-B., Chen, Y.-Q., and Ghosh, G. (1998). Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- $\kappa$ b bound to DNA. *Nature*, 391(6665):410–413.
- Christophers, E. (2003). Targeting t-cell subsets to achieve remission. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 17 Suppl 2:6–11.
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of stat3 signal transduction by pias3. *Science (New York, N.Y.)*, 278:1803–1805.
- Courtois, G.; Israël, A. (2000). Nf-kappa b defects in humans: the nemo/incontinentia pigmenti connection. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2000:pe1.
- Danker, K., Reutter, W., and Semini, G. (2010). Glycosidated phospholipids: uncoupling of signalling pathways at the plasma membrane. *British Journal of Pharmacology*, 160(1):36–47.
- Darnell, J. E. (1997). Stats and gene regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 277:1630–1635.
- Decker, T., Lew, D. J., and Darnell, J. E. (1991). Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene. *Molecular and cellular biology*, 11:5147–5153.
- Dirschka, T., Hartwig, R., and Oster-Schmidt, C. (2011). *Klinikleitfaden Dermatologie: Mit Zugang zur Medizinwelt*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH (9. November 2010), 3.aufgabe edition.
- Duh, E. J., Maury, W. J., Folks, T. M., Fauci, A. S., and Rabson, A. B. (1989). Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the nf-kappa b sites in the long terminal repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86:5974–5978.

- Egeberg, A. (2016). Psoriasis and comorbidities. epidemiological studies. *Danish medical journal*, 63.
- Eibl, H.; Unger, C. (1990). Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. *Cancer treatment reviews*, 17:233–242.
- Erbar, P. (1995). *Onkologie Compat Lehrbuch*. F.K. Schattauer, 2. überarbeitete auflage edition.
- Eriksen, K. W., Lovato, P., Skov, L., Krejsgaard, T., Kaltoft, K., Geisler, C., and Ødum, N. (2005). Increased sensitivity to interferon- $\alpha$  in psoriatic t cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(5):936–944.
- Fan, Chen-Ming; Maniatis, T. (1991). Generation of p50 subunit of NF- $\kappa$ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature*, 354(6352):395–398.
- Faustman, Denise; Davis, M. (2010). TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(6):482–493.
- Ferrándiz, C., Bordas, X., García-Patos, V., Puig, S., Pujol, R., and Smandía, A. (2001). Prevalence of psoriasis in spain (epiderma project: phase i). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 15:20–23.
- Fischer, A., Müller, D., Zimmermann-Kordmann, M., Kleuser, B., Mickleit, M., Laabs, S., Löwe, W., Cantagrel, F., Reutter, W., and Danker, K. (2006). The ether lipid inositol-c2-PAF is a potent inhibitor of cell proliferation in HaCaT cells. *ChemBioChem*, 7(3):441–449.
- Forkel, S., Schön, M., Hildmann, A., Claßen, A., John, S.-M., Danker, K., and Schön, M. P. (2014). Inositoylated platelet-activating factor (ino-c2-paf) modulates dynamic lymphocyte-endothelial cell interactions and alleviates psoriasis-like skin inflammation in two complementary mouse models. *The Journal of investigative dermatology*, 134:2510–2520.
- Fridman, J. S., Scherle, P. A., Collins, R., Burn, T., Neilan, C. L., Hertel, D., Contel, N., Haley, P., Thomas, B., Shi, J., Collier, P., Rodgers, J. D., Shepard, S., Metcalf, B., Hollis, G., Newton, R. C., Yeleswaram, S., Friedman, S. M., and Vaddi, K.

- (2011). Preclinical evaluation of local JAK1 and JAK2 inhibition in cutaneous inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(9):1838–1844.
- Fry, L. (1988). Psoriasis. *The British journal of dermatology*, 119:445–461.
- Gajate, C., Santos-Beneit, A., Modolell, M., and Mollinedo, F. (1998). Involvement of c-jun nh2-terminal kinase activation and c-jun in the induction of apoptosis by the ether phospholipid 1-o-octadecyl-2-o-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *Molecular pharmacology*, 53:602–612.
- Gajate, Consuelo; Mollinedo, F. (2002). Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid et-18-och(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Current drug metabolism*, 3:491–525.
- Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F. J., Zal, T., and Gilliet, M. (2009). Self-RNA–antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(9):1983–1994.
- Gelfand, J. M., Troxel, A. B., Lewis, J. D., Kurd, S. K., Shin, D. B., Wang, X., Margolis, D. J., and Strom, B. L. (2007). The risk of mortality in patients with psoriasis. *Archives of Dermatology*, 143(12).
- Genestier, L., Paillot, R., Fournel, S., Ferraro, C., Miossec, P., and Revillard, J. P. (1998). Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral t cells. *Journal of Clinical Investigation*, 102(2):322–328.
- Ghosh, Sankar; Hayden, M. S. (2008). New regulators of nf-kappab in inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 8:837–848.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF- $\kappa$ b AND REL PROTEINS: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16(1):225–260.
- Girolomoni, G., Sebastiani, S., Albanesi, C., and Cavani, A. (2001). T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Current opinion in immunology*, 13:733–737.

- Goldminz, A. M., Au, S. C., Kim, N., Gottlieb, A. B., and Lizzul, P. F. (2013). NF- $\kappa$ b: An essential transcription factor in psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 69(2):89–94.
- Gottlieb, A. B., Chamian, F., Masud, S., Cardinale, I., Abello, M. V., Lowes, M. A., Chen, F., Magliocco, M., and Krueger, J. G. (2005). Tnf inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175:2721–2729.
- Griffiths, C. E. M., Christophers, E., Barker, J. N. W. N., Chalmers, R. J. G., Chimenti, S., Krueger, G. G., Leonardi, C., Menter, A., Ortonne, J.-P., and Fry, L. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *British Journal of Dermatology*, 156(2):258–262.
- Grivennikov, Sergei I.; Karin, M. (2010). Dangerous liaisons: Stat3 and nf-kappab collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 21:11–19.
- Grivennikov, Sergei; Karin, M. (2008). Autocrine IL-6 signaling: A key event in tumorigenesis? *Cancer Cell*, 13(1):7–9.
- Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Sigmundsdottir, H., and Valdimarsson, H. (2004). Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clinical and experimental immunology*, 135:1–8.
- Gupta, S. C., Kim, J. H., Prasad, S., and Aggarwal, B. B. (2010a). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer metastasis reviews*, 29:405–434.
- Gupta, S. C., Sundaram, C., Reuter, S., and Aggarwal, B. B. (2010b). Inhibiting NF- $\kappa$ b activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10-12):775–787.
- Gveric, D., Kaltschmidt, C., Cuzner, M. L., and Newcombe, J. (1998). Transcription factor nf-kappab and inhibitor i kappabalpha are localized in macrophages in active multiple sclerosis lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 57:168–178.

- Hald, A., Andrés, R. M., Salskov-Iversen, M. L., Kjellerup, R. B., Iversen, L., and Johansen, C. (2013). Stat1 expression and activation is increased in lesional psoriatic skin. *The British journal of dermatology*, 168:302–310.
- Harden, J. L., Krueger, J. G., and Bowcock, A. M. (2015). The immunogenetics of psoriasis: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*, 64:66–73.
- Haskill, S., Beg, A. A., Tompkins, S. M., Morris, J. S., Yurochko, A. D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P., and Baldwin, A. S. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes i kappa b-like activity. *Cell*, 65:1281–1289.
- Hayden, M. S. (2004). Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes & Development*, 18(18):2195–2224.
- Hengge, U. R. (2006). Gene therapy progress and prospects: the skin – easily accessible, but still far away. *Gene Therapy*, 13(22):1555–1563.
- Henseler, T.; Christophers, E. (1995). Disease concomitance in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 32:982–986.
- Henseler, T. (1997). The genetics of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 37:S1–11.
- Herrmann, D. B. (1985). Changes in cellular lipid synthesis of normal and neoplastic cells during cytolysis induced by alkyl lysophospholipid analogues. *Journal of the National Cancer Institute*, 75:423–430.
- Hilgard, P., Klenner, T., Stekar, J., Nössner, G., Kutscher, B., and Engel, J. (1997). D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 33:442–446.
- Hilton, W. S. A. D. J. (2004). The Role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) proteins in Regulation of the Immune Response. *Annual Review of Immunology*, 22(1):503–529.
- Igarashi, K., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A. F., Harpur, A. G., Larner, A. C., and Finbloom, D. S. (1994). Interferon-gamma induces tyrosine

- phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, jak1 and jak2, with its receptor. *The Journal of biological chemistry*, 269:14333–14336.
- Jiménez-López, J. M., Carrasco, M. P., Segovia, J. L., and Marco, C. (2002). Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of hepg2 cells. *European journal of biochemistry*, 269:4649–4655.
- Jost, P. J.; Ruland, J. (2006). Aberrant NF- $\kappa$ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences and therapeutic implications. *Blood*.
- Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., and Baeuerle, P. A. (1993). Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor nf-kappa b. *Mechanisms of development*, 43:135–147.
- Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Lannes-Vieira, J., Kreutzberg, G. W., Wekerle, H., Baeuerle, P. A., and Gehrman, J. (1994). Transcription factor nf-kappa b is activated in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 55:99–106.
- Katze, M. G., He, Y., and Gale, M. (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature Reviews Immunology*, 2(9):675–687.
- Kile, B. T.; Alexander, W. S. (2001). The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(11):1627–1635.
- Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M., and Saito, M. (2000). Mail, a novel nuclear  $\kappa$ B protein that potentiates lps-induced il-6 production. *FEBS letters*, 485:53–56.
- Klaile, E. (2006). *Identifizierung und Charakterisierung neuer intrazellulärer Bindungspartner von CEACAM1-L und deren Einfluss auf CEACAM1-L-vermittelte zelluläre Funktionen*. phdthesis, Freie Universität Berlin.
- Kontzias, A., Kotlyar, A., Laurence, A., Changelian, P., and O'Shea, J. J. (2012). Jakinibs: a new class of kinase inhibitors in cancer and autoimmune disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(4):464–470.

- Krebs, Danielle L.; Hilton, D. J. (2001). SOCS proteins: Negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 19(5):378–387.
- Krueger, A. M. B. J. G. (2005). Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature Reviews Immunology*, 5(9):699–711.
- Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M., and Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 82:434–448.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F. O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J.-M., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449(7162):564–569.
- Lavon, I., Goldberg, I., Amit, S., Landsman, L., Jung, S., Tsuberi, B. Z., Barshack, I., Kopolovic, J., Galun, E., Bujard, H., and Ben-Neriah, Y. (2000). High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte nf-kappaB activation. *Nature medicine*, 6:573–577.
- Lawrence, T., Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., and Willoughby, D. A. (2001). Possible new role for NF- $\kappa$ B in the resolution of inflammation. *Nature Medicine*, 7(12):1291–1297.
- Lee, H., Herrmann, A., Deng, J.-H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., Forman, S., Jove, R., Pardoll, D. M., and Yu, H. (2009). Persistently activated stat3 maintains constitutive nf-kappaB activity in tumors. *Cancer cell*, 15:283–293.
- Leonard, W. J. (2001). Role of jak kinases and stats in cytokine signal transduction. *International journal of hematology*, 73:271–277.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K. (1998). Inhibition of stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18):10626–10631.
- Lizzul, P. F., Aphale, A., Malaviya, R., Sun, Y., Masud, S., Dombrovskiy, V., and Gottlieb, A. B. (2005). Differential expression of phosphorylated nf-kappaB/rela

- in normal and psoriatic epidermis and downregulation of nf-kappab in response to treatment with etanercept. *The Journal of investigative dermatology*, 124:1275–1283.
- Lohmeyer, M.; Workman, P. (1995). Growth arrest vs direct cytotoxicity and the importance of molecular structure for the in vitro anti-tumour activity of ether lipids. *British Journal of Cancer*, 72(2):277–286.
- Lønnberg, A. S., Skov, L., Skytthe, A., Kyvik, K. O., Pedersen, O. B., and Thomsen, S. F. (2015). Smoking and risk for psoriasis: a population-based twin study. *International Journal of Dermatology*, 55(2):e72–e78.
- Lowes, M. A., Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445(7130):866–873.
- Lowes, M. A., Suárez-Fariñas, M., and Krueger, J. G. (2014). Immunology of psoriasis. *Annual Review of Immunology*, 32(1):227–255.
- Menssen, A., Trommler, P., Vollmer, S., Schendel, D., Albert, E., Gürtler, L., Riethmüller, G., and Prinz, J. C. (1995). Evidence for an antigen-specific cellular immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155:4078–4083.
- Mesa, R. A. (2010). Ruxolitinib, a selective jak1 and jak2 inhibitor for the treatment of myeloproliferative neoplasms and psoriasis. *IDrugs : the investigational drugs journal*, 13:394–403.
- Mickeleit, M., Wieder, T., Arnold, M., Geilen, C. C., Mulzer, J., and Reutter, W. (1998). A glucose-containing ether lipid (glc-paf) as an antiproliferative analogue of the platelet-activating factor. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 37:351–353.
- Mickeleit, M., Wieder, T., Buchner, K., Geilen, C., Mulzer, J., and Reutter, W. (1995). Glyceroglycophospholipid (glc-PC), ein neuartiges glucosidisches phospholipid. *Angewandte Chemie*, 107(23-24):2879–2881.

- Moll, I. (2010a). *Duale Reihe Dermatologie*, chapter 4, pages 41–85. Thieme, 7. Auflage edition.
- Moll, I. (2010b). *Duale Reihe Dermatologie*, chapter 11.1.3, page 371. Thieme, 7. Auflage edition.
- Mollinedo, F., Gajate, C., Martín-Santamaría, S., and Gago, F. (2004). Et-18-och3 (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of fas/cd95 death receptor. *Current medicinal chemistry*, 11:3163–3184.
- Monteleone, G., Pallone, F., MacDonald, T. T., Chimenti, S., and Costanzo, A. (2011). Psoriasis: from pathogenesis to novel therapeutic approaches. *Clinical Science*, 120(1):1–11.
- Moorchung, N., Kulaar, J. S., Chatterjee, M., Vasudevan, B., Tripathi, T., and Dutta, V. (2013). Role of NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of psoriasis elucidated by its staining in skin biopsy specimens. *International Journal of Dermatology*, 53(5):570–574.
- Mrowietz, U., Kragballe, K., Reich, K., Spuls, P., Griffiths, C. E. M., Nast, A., Franke, J., Antoniou, C., Arenberger, P., Balieva, F., Bylaite, M., Correia, O., Daudén, E., Gisondi, P., Iversen, L., Kemény, L., Lahfa, M., Nijsten, T., Rantanen, T., Reich, A., Rosenbach, T., Segaert, S., Smith, C., Talme, T., Volc-Platzter, B., and Yawalkar, N. (2010). Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a european consensus. *Archives of Dermatological Research*, 303(1):1–10.
- Munder, P. G.; Modolell, M. (1973). Adjuvant induced formation of lysophosphatides and their role in the immune response. *International Archives of Allergy and Immunology*, 45:133–135.
- Munder, P. G., Modolell, M., Ferber, E., and Fischer, H. (1966). Phospholipids in quartz-damaged macrophages. *Biochemische Zeitschrift*, 344:310–313.
- Müller, W.; Graf, U. (1981). The treatment of psoriasis-arthritis with cyclosporin a, a new immunosuppressive agent. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*, 111:408–413.

- Nast, A., Amelunxen, L., Augustin, M., Boehncke, W.-H., Dressler, C., Gaskins, M., Härle, P., Hoffstadt, B., Klaus, J., Koza, J., Mrowietz, U., Ockenfels, H.-M., Philipp, S., Reich, K., Rosenbach, T., Rzany, B., Schlaeger, M., Schmid-Ott, G., Sebastian, M., von Kiedrowski, R., and Weberschock, T. (2017). S3 - leitlinie zur therapie der psoriasis vulgaris. *AWMF online - Portal der wissenschaftlichen Medizin*.
- Nast, A., Boehncke, W., Mrowietz, U., Ockenfels, H., Philipp, S., Reich, K., Rosenbach, T., Sammain, A., Schlaeger, M., Sebastian, M., Sterry, W., Streit, V., Augustin, M., Erdmann, R., Klaus, J., Koza, J., Müller, S., Orzechowski, H., Rosumeck, S., Schmid-Ott, G., Weberschock, T., and Rzany, B. (2011). S3 - leitlinie zur therapie der psoriasis vulgaris update 2011. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9.
- Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.-J., and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- $\alpha$  production. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(1):135–143.
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H., and Barker, J. (2009). Psoriasis. *The New England journal of medicine*, 361:496–509.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of rel/nf-kappab transcription factors. *Oncogene*, 18:6853–6866.
- Pahl, H. L.; Baeuerle, P. A. (1997). The er-overload response: activation of nf-kappa b. *Trends in biochemical sciences*, 22:63–67.
- Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., and Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the nf-kappa b1 precursor protein and the activation of nf-kappa b. *Cell*, 78:773–785.
- Prinz, J. C., Vollmer, S., Boehncke, W. H., Menssen, A., Laisney, I., and Trommler, P. (1999). Selection of conserved tcr v<sub>dj</sub> rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. *European journal of immunology*, 29:3360–3368.

- Rácz, E., Prens, E. P., Kurek, D., Kant, M., de Ridder, D., Mourits, S., Baerveldt, E. M., Ozgur, Z., van IJcken, W. F. J., Laman, J. D., Staal, F. J., and van der Fits, L. (2011). Effective treatment of psoriasis with narrow-band UVB phototherapy is linked to suppression of the IFN and th17 pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(7):1547–1558.
- Radtke, M., Reich, K., Blome, C., Kopp, I., Rustenbach, S., Schäfer, I., and Augustin, M. (2009). Evaluation of quality of care and guideline-compliant treatment in psoriasis. *Dermatology*, 219(1):54–58.
- Ruben, S. M., Dillon, P. J., Schreck, R., Henkel, T., Chen, C. H., Maher, M., Baeuerle, P. A., and Rosen, C. A. (1991). Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF- $\kappa$ B. *Science (New York, N. Y.)*, 251:1490–1493.
- Ruiter, G. A., Verheij, M., Zerp, S. F., and van Blitterswijk, W. J. (2001). Alkyllysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 49:415–419.
- Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J., and Verheij, M. (1999). Alkyllysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer research*, 59:2457–2463.
- Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J., and Verheij, M. (2003). Anti-cancer alkyllysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anti-cancer drugs*, 14:167–173.
- Ryseck, R. P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., and Bravo, R. (1992). RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF- $\kappa$ B. *Molecular and cellular biology*, 12:674–684.
- Saalmann, G.; Schlange-Schöningen, H. (1998). *Die Psoriasis: Geschichte und Therapie vom Altertum bis zur Gegenwart*. Saalmann, G.
- Sakatsume, M., Igarashi, K., Winestock, K. D., Garotta, G., Larner, A. C., and Finbloom, D. S. (1995). The JAK kinases differentially associate with the alpha and

- beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating stat transcription factors. *The Journal of biological chemistry*, 270:17528–17534.
- Samadder, P., Bittman, R., Byun, H.-S., and Arthur, G. (2004). Synthesis and use of novel ether phospholipid enantiomers to probe the molecular basis of the antitumor effects of alkyllysophospholipids: correlation of differential activation of c-jun NH2-terminal protein kinase with antiproliferative effects in neuronal tumor cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(10):2710–2713.
- Scheidereit, C. (2006). I $\kappa$ b kinase complexes: gateways to NF- $\kappa$ b activation and transcription. *Oncogene*, 25(51):6685–6705.
- Schmitz, M. L.; Baeuerle, P. A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of nf-kappa b. *The EMBO journal*, 10:3805–3817.
- Schürer, N., Köhne, A., Schliep, V., Barlag, K., and Goerz, G. (1993). Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 2(4):179–185.
- Semini, G., Hildmann, A., Klein, A., Lucka, L., Schön, M., Schön, M. P., Shmanai, V., and Danker, K. (2014a). Inositol-c2-paf down-regulates components of the antigen presentation machinery in a 2d-model of epidermal inflammation. *Biochemical pharmacology*, 87:477–488.
- Semini, G., Hildmann, A., Reissig, H.-U., Reutter, W., and Danker, K. (2011a). The novel synthetic ether lipid inositol-c2-paf inhibits phosphorylation of the tyrosine kinases src and fak independent of integrin activation in transformed skin cells. *Biochemical pharmacology*, 81:985–995.
- Semini, G., Hildmann, A., von Haefen, C., and Danker, K. (2014b). Glycosidated phospholipids - a promising group of anti-tumour lipids. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 14:607–617.

- Semini, G., Klein, A., and Danker, K. (2011b). Impact of alkylphospholipids on the gene expression profile of HaCaT cells. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7):375–387.
- Sen, R.; Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein nf-kappa b by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47:921–928.
- Sethi, G., Sung, B., and Aggarwal, B. B. (2008). Nuclear factor- $\kappa$ b activation: From bench to bedside. *Experimental Biology and Medicine*, 233(1):21–31.
- Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, 19(21):2638–2644.
- Sterry, W.; Paus, R. (2004). *Checkliste Dermatologie*. Thieme Georg Verlag.
- Stricker, S. (2019). Inositol-c2-paf: Ein inhibitor des stat3-signalwegs. *Unpublished*. Wird vermutlich im Jahr 2019 publiziert.
- Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., and Greene, W. C. (1993). Nf-kappa b controls expression of inhibitor i kappa b alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 259:1912–1915.
- Telliez, J.-B., Dowty, M. E., Wang, L., Jussif, J., Lin, T., Li, L., Moy, E., Balbo, P., Li, W., Zhao, Y., Crouse, K., Dickinson, C., Symanowicz, P., Hegen, M., Banker, M. E., Vincent, F., Unwalla, R., Liang, S., Gilbert, A. M., Brown, M. F., Hayward, M., Montgomery, J., Yang, X., Bauman, J., Trujillo, J. I., Casimiro-Garcia, A., Vajdos, F. F., Leung, L., Geoghegan, K. F., Quazi, A., Xuan, D., Jones, L., Hett, E., Wright, K., Clark, J. D., and Thorarensen, A. (2016). Discovery of a JAK3-selective inhibitor: Functional differentiation of JAK3-selective inhibition over pan-JAK or JAK1-selective inhibition. *ACS Chemical Biology*, 11(12):3442–3451.
- Ten, R. M., Paya, C. V., Israël, N., Le Bail, O., Mattei, M. G., Virelizier, J. L., Kourilsky, P., and Israël, A. (1992). The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of nf-kappa b indicates that it participates in its own regulation. *The EMBO journal*, 11:195–203.

- Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. (1995). I kappa b-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of nf-kappa b. *Cell*, 80:573–582.
- Thorleifsdottir, R. H., Sigurdardottir, S. L., Sigurgeirsson, B., Olafsson, J. H., Sigurdsson, M. I., Petersen, H., Arnadottir, S., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., and Valdimarsson, H. (2012). Improvement of psoriasis after tonsillectomy is associated with a decrease in the frequency of circulating t cells that recognize streptococcal determinants and homologous skin determinants. *The Journal of Immunology*, 188(10):5160–5165.
- Tigalonowa, M., Bjerke, J. R., Gallati, H., and Matre, R. (1989). Immunological changes following treatment of psoriasis with cyclosporin. *Acta dermato-venereologica. Supplementum*, 146:142–5; discussion 146.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76:4350–4354.
- Ueberla, K., Lu, Y., Chung, E., and Haseltine, W. A. (1993). The nf-kappa b p65 promoter. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, 6:227–230.
- Unger, C.; Eibl, H. (2001). Arzneimittelentwicklung aus phospholipiden. *Oncology Research and Treatment*, 24(1):18–23.
- Valdimarsson, H. (2007). The genetic basis of psoriasis. *Clinics in Dermatology*, 25(6):563–567.
- Valdimarsson, H., Bake, B. S., Jónsdóttir, I., and Fry, L. (1986). Psoriasis: a disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by t lymphocytes. *Immunology today*, 7:256–259.
- Valdimarsson, H., Thorleifsdottir, R. H., Sigurdardottir, S. L., Gudjonsson, J. E., and Johnston, A. (2009). Psoriasis – as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends in Immunology*, 30(10):494–501.

- van Blitterswijk, W. J., Hilkmann, H., and Storme, G. A. (1987). Accumulation of an alkyl lysophospholipid in tumor cell membranes affects membrane fluidity and tumor cell invasion. *Lipids*, 22:820–823.
- van der Fits, L., Van der wel, L. I., Laman, J. D., Prens, E. P., and Verschuren, M. C. (2004). In psoriasis lesional skin the type i interferon signaling pathway is activated, whereas interferon- $\alpha$  sensitivity is unaltered. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(1):51–60.
- Verma, I. M. (2004). Nuclear factor (NF)- $\kappa$  b proteins: therapeutic targets. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(suppl\_2):ii57–ii61.
- Vollmer, S., Menssen, A., and Prinz, J. C. (2001). Dominant lesional t cell receptor rearrangements persist in relapsing psoriasis but are absent from nonlesional skin: Evidence for a stable antigen-specific pathogenic t cell response in psoriasis vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(5):1296–1301.
- Wagner, E. F., Schonhaler, H. B., Guinea-Viniegra, J., and Tschachler, E. (2010). Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(12):704–714.
- Wang, L., Walia, B., Evans, J., Gewirtz, A. T., Merlin, D., and Sitaraman, S. V. (2003). Il-6 induces nf-kappa b activation in the intestinal epithelia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171:3194–3201.
- West, K. (2009). Cp-690550, a jak3 inhibitor as an immunosuppressant for the treatment of rheumatoid arthritis, transplant rejection, psoriasis and other immune-mediated disorders. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 10:491–504.
- Whiteside, S. T. (1997). I kappa b epsilon, a novel member of the ikappa b family, controls RelA and cRel NF-kappa b activity. *The EMBO Journal*, 16(6):1413–1426.
- Wulczyn, F. G., Krappmann, D., and Scheidereit, C. (1996). The nf-kappa b/rel and i kappa b gene families: mediators of immune response and inflammation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 74:749–769.

- Wulczyn, F. G., Naumann, M., and Scheidereit, C. (1992). Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF- $\kappa$ b. *Nature*, 358(6387):597–599.
- Yokota, A., Hukazawa, M., Nakaseko, C., Ishii, A., Ikegami, T., Kogure, K., Nishimura, M., Matsuura, Y., Morio, S., Nakamura, H., Oh, H., Hiruma, K., Asai, T., and Tanabe, E. (1996). Resolution of psoriasis vulgaris following allogeneic bone marrow transplantation for aplastic anemia. [*Rinsho ketsueki*] *The Japanese journal of clinical hematology*, 37:35–39.
- Yu, Z., Zhang, W., and Kone, B. C. (2002). Signal transducers and activators of transcription 3 (stat3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappa b. *The Biochemical journal*, 367:97–105.
- Zaba, L. C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N. J., Abello, M. V., Novitskaya, I., Pierson, K. C., Gonzalez, J., Krueger, J. G., and Lowes, M. A. (2009). Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and th1/th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *The Journal of investigative dermatology*, 129:79–88.
- Zheng, Y., Danilenko, D. M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2006). Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 445(7128):648–651.
- Zhou, X., Lu, X., Richard, C., Xiong, W., Litchfield, D. W., Bittman, R., and Arthur, G. (1996). 1-o-octadecyl-2-o-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured MCF-7 cells. *Journal of Clinical Investigation*, 98(4):937–944.



# Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Kremp, Stefanie, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Die Wirkung des glykosidierten Phospholipids Inositol-C2-PAF auf die Transkriptionsfaktoren NFκB und STAT1 in humanen Keratinozyten./The effect of the glycosidated phospholipid Inositol-C2-PAF on the transcription factors NFκB and STAT1 in human keratinocytes.] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 13. September 2020

Stefanie Kremp



# Curriculum Vitae

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



# Danksagung

Ich danke von ganzen Herzen Privatdozentin Dr. Kerstin Danker für die Vergabe des Themas und die durchgehende Unterstützung meiner Arbeit. Gudrun Mrawietz für Ihre Hilfe, Unterstützung und für ein immer offenes Ohr. Zudem danke ich meinem Mann Björn Kremp und meinen zwei Kindern Benedict und Smilla, die immer an meiner Seite stehen und mich in guten wie in schlechten Zeiten unterstützen. Besonders danke ich Marcel Berkholz für die Hilfe bei der technischen Umsetzung meiner Arbeit.

