

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

DISSERTATION

Inositol-C2-PAF: Ein Inhibitor des STAT3-Signalwegs

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Stricker

aus Simmern

Datum der Promotion: 04.03.2022

Vorwort

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Pelz C, Häckel S, Semini G, Schrötter S, Bintig W, Stricker S, Mrawietz G, Klein A, Lucka L, Shmanai V, Eickholt B, Hildmann A, Danker K. Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2018 Oct;41(5):505-516. doi: 10.1007/s13402-018-0387-3. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30047091.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
Abstract (English)	12
Kurzdarstellung (Deutsch)	13
1. Einführung	14
1.1. Psoriasis	15
1.1.1. Symptome der Psoriasis.....	15
1.1.2. Relevanz der Psoriasis	15
1.1.3. Pathogenese der Psoriasis	17
1.1.3.1. Phase der Entstehung	17
1.1.3.2. Phase der Aufrechterhaltung.....	19
1.1.4. <i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Modelle	22
1.1.5. Behandlung der Psoriasis	24
1.1.5.1. Aktuelle Behandlungsoptionen	25
1.1.5.2. Neuartige und zukünftige Therapieoptionen.....	28
1.2. STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription	30
1.2.1. STAT-Domänen.....	30
1.2.2. Aktivierung der STATs.....	31
1.2.3. Aktivatoren der STATs.....	31
1.2.3.1. Gp130-vermittelte Signaltransduktion	32
1.2.3.2. Januskinasen.....	33
1.2.3.3. Interleukin-6.....	33
1.2.3.4. Oncostatin M	35
1.2.4. Translokation von STATs in den Zellkern	36

1.2.5. Folgen der Aktivierung der STATs.....	36
1.2.6. STAT3 und Psoriasis	37
1.3. Antitumorlipide	38
1.3.1. Wirkmechanismen der Antitumorlipide	39
1.3.1.1. Beeinflussung des Phospholipidmetabolismus.....	39
1.3.1.2. Beeinflussung der Membraneigenschaften.....	39
1.3.1.3. Beeinflussung der Elektrolytbalance.....	40
1.3.1.4. Beeinflussung des Nährstofftransports	40
1.3.1.5. Beeinflussung intrazellulärer Signalwege	40
1.3.2. Inositol-C2-PAF	41
1.4. Ziele dieser Arbeit.....	43
2. Material und Methoden	44
2.1. Zellkultur.....	44
2.1.1. Materialien in der Zellkultur.....	44
2.1.2. Kryokonservierung und Inkulturnahme von Zellen.....	46
2.1.3. Standardisiertes Zellkulturprotokoll.....	46
2.1.4. Behandlung mit Zytokinen und Inositol-C2-PAF	47
2.2. Biochemische Methoden.....	47
2.2.1. Western Blot	47
2.2.1.1. Materialien in der Western Blot-Technik.....	47
2.2.1.2. Proteinquantifizierung	50
2.2.1.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	50
2.2.1.4. Western Blot	50
2.2.2. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	51
2.2.2.1. Materialien in der qRT-PCR-Technik.....	51
2.2.2.2. RNA-Vorbereitung	52
2.2.2.3. cDNA-Synthese	52
2.2.2.4. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	53
2.2.3. Immunfluoreszenz	53
2.3. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	54
2.3.1. Auswertung der Western Blots	54
2.3.2. Auswertung der qRT-PCRs	55

2.3.3. Grafische Darstellung	55
3. Ergebnisse.....	57
3.1. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf STAT3	57
3.1.1. Analyse der Proteinexpression	57
3.1.2. Analyse der mRNA-Expression	59
3.2. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705	64
3.2.1. Analyse der Proteinexpression und der Phosphorylierung nach Kurzzeitstimulation durch Interleukin-6.....	64
3.2.2. Analyse der Proteinexpression und der Phosphorylierung nach Langzeitstimulation durch Interleukin-6	66
3.2.3. Untersuchung der beobachteten Einflüsse auf STAT3-Expression und - Phosphorylierung in Anwesenheit weiterer löslicher Mediatoren.....	68
3.3. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT3 und pSTAT3	70
3.4. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Expression STAT3-abhängiger Gene.....	73
3.5. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf AKT	82
3.5.1. Der Einfluss auf AKT auf Proteinebene	82
3.5.2. Der Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT an Ser473 nach Kurzzeitstimulation	84
3.5.3. Der Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT an Ser473 nach Langzeitstimulation.....	86
4. Diskussion.....	88
4.1. Alkylphospholipide als neuartige Therapie der Psoriasis	88
4.2. Inositol-C2-PAF reduziert die Gesamtmenge an STAT3 in Keratinozyten .	90
4.3. Inositol-C2-PAF reduziert die Phosphorylierung von STAT3.....	92
4.4. Inositol-C2-PAF reduziert die nukleäre Lokalisation von STAT3.....	94
4.5. Inositol-C2-PAF reduziert die Expression STAT3-abhängiger Gene.....	96
4.5.1. BIRC5 / Survivin	96
4.5.2. S100A7	97

4.5.3. Cyclin D1	98
4.5.4. Interleukin-6	98
4.6. Inositol-C2-PAF inhibiert den Akt-Signalweg	101
4.7. Inositol-C2-PAF unterbricht den proinflammatorischen Kreislauf	102
4.8. Das Potential von Inositol-C2-PAF	104
5. Literaturverzeichnis	106
Eidesstattliche Versicherung	131
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	132
Lebenslauf	133
Publikationsliste	134
Danksagung	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes 7-Schritt-Modell der Aufrechterhaltung psoriatischer Läsionen.....	22
Abbildung 2: Domänen der STATs.....	31
Abbildung 3: Die Aktivierung von STAT3 über den Gp130/IL6R-Komplex	35
Abbildung 4: Die Grundstruktur der Alkylphospholipide (APLs).....	38
Abbildung 5: Die Struktur von Inositol-C2-PAF.....	41
Abbildung 6: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf STAT3 auf Proteinebene.....	58
Abbildung 7: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von STAT3....	60
Abbildung 8: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von STAT3.	62
Abbildung 9: Der Einfluss von Zytokinen und Inositol-C2-PAF auf STAT3, Auswertung von Primärdaten von Semini et al.....	63
Abbildung 10: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf pSTAT3 ^{Tyr705} auf Proteinebene nach 30 Minuten.	65
Abbildung 11: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf pSTAT3 ^{Tyr705} auf Proteinebene.....	67
Abbildung 12: Der Einfluss von verschiedenen Zytokinen und Inositol-C2-PAF auf pSTAT3 ^{Tyr705} im Vergleich zu STAT3 auf Proteinebene nach kurzer Stimulation.	68
Abbildung 13: Der Einfluss von verschiedenen Oncostatin M, Epidermalem Wachstumsfaktor und Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705.....	69
Abbildung 14: Der Einfluss von verschiedenen Zytokinen und Inositol-C2-PAF auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT3 und pSTAT3 ^{Tyr705}	71
Abbildung 15: Der Einfluss von Inhibitoren des STAT3-Pathways auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT3.	72
Abbildung 16: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von BIRC5. .	74
Abbildung 17: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von S100A7 und CCND1.....	75

Abbildung 18: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von Interleukin-6.	77
Abbildung 19: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von Interleukin-6: Untersuchungen durch andere Wissenschaftler.	78
Abbildung 20: Der Einfluss von Interleukin 6 und Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von S100A7.	80
Abbildung 21: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von BIRC5.	81
Abbildung 22: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf AKT auf Proteinebene.	83
Abbildung 23: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf pAKTSer473 auf Proteinebene nach Kurzzeitstimulation.	85
Abbildung 24: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf pAKTSer473 auf Proteinebene.	87
Abbildung 25: Der positiv-selbstverstärkende proinflammatorische Kreislauf der auto- und parakrinen Sekretion von Interleukin-6 in psoriatischen Hautläsionen.	99
Abbildung 26: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf proinflammatorische Kreisläufe in Dermis und Epidermis.	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lokal anzuwendende Arzneimittel zur Behandlung der Psoriasis.....	26
Tabelle 2: Systemisch wirksame Arzneimittel zur Behandlung der Psoriasis.	27
Tabelle 3: Zelllinie.....	44
Tabelle 4: Nährmedien und Zusätze.....	44
Tabelle 5: Arbeitsmaterialien in der Zellkultur und zur Zellernte.....	45
Tabelle 6: Zytokine.....	45
Tabelle 7: Geräte in der Western Blot-Technik.....	47
Tabelle 8: Lösungen zum Gießen von Blot-Gelen.....	47
Tabelle 9: Puffer-, Spül-, Blockier- und Färbelösungen in der Western Blot-Technik ...	48
Tabelle 10: Antikörper.....	48
Tabelle 11: Proteinmarker und Chemilumineszenzlösungen in der Western Blot- Technik.....	49
Tabelle 12: Geräte in der qRT-PCR-Technik.....	51
Tabelle 13: Ausrüstung zur RNA-Gewinnung, cDNA-Synthese und qRT-PCR.....	51
Tabelle 14: Verwendete Primer.....	52

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständiger Name
AKT	Strenggenommen keine Abkürzung, Kunstwort abgeleitet von der Zelllinie, in der es entdeckt wurde, im englischsprachigen Raum synonym mit Proteinkinase B, in der deutschen Literatur teilweise nur für das Gen der Proteinkinase B verwendet
APC	Antigen-präsentierende Zelle, bei manchen Autoren auch: Alkylphosphocholin
APL	Alkylphospholipid
ATL	Antitumorlipid
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BCA	Bicinchoninsäure
BIRC5	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5, Synonym: Survivin
BSA-Score	Body Surface Area (Anteil der Körperoberfläche, der von Psoriasis betroffen ist, in Prozent angegeben)
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	Coiled-coil Domäne von STATs
CCND1	Cyclin D1
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	Schwellenwertzyklus (cycle threshold)
CXCL	Chemokin, C-X-C motif ligand
DBD	DNA-bindende Domäne von STATs
DLQI	Dermatologischer Lebensqualitäts-Index (Einschränkung der Lebensqualität durch Psoriasis)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFR	Epidermal growth factor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
E-Selektin	Endothelial-leukocyte-Selektin
FBS	Fötale Kälberserum (fetal bovine serum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Gamma-Activated Site
Gp	Glykoprotein
HaCaT	Name der Zelllinie, abgeleitet von „human adult keratinocytes kept in high calcium at low temperature“
HER	Human epidermal growth factor-Rezeptor
ICAM	Zelladhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule)
IFN	Interferon

IKK	I-κB-Kinase, Bestandteil des NF-κB-Signalwegs
IL	Interleukin, zum Beispiel Interleukin-6 (IL-6)
Ino / Ino-PAF / Ino-C2-PAF	Inositol-C2-PAF
JAK	Just Another Kinase / Januskinase
LL37	Strenggenommen keine Abkürzung, antimikrobielles Peptid mit einer Länge von 37 Aminosäuren, deren die beiden ersten Leucin sind
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cells
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, Transkriptionsfaktor
NH ₂ -Domäne	Amino-terminale Domäne von STATs
OSM	Oncostatin M
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PASI	Psoriasis Area and Severity-Index (von Psoriasis betroffenes Gebiet und Symptomschwere)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PKB	Proteinkinase B
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Englisch: quantitative real-time polymerase chain reaction)
Rho	Ras homologue
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
S100A7	S100 calcium-binding protein A7, Synonym: Psoriasin
SH2	Src homology 2
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAD	Transkriptionsaktivierende Domäne von STATs
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helferzelle
TK	Tyrosinkinase
TNF	Tumornekrosefaktor, zum Beispiel Tumornekrosefaktor α (TNF-α)
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Abstract (English)

Introduction: The alkylphospholipid (APL) Inositol-C2-PAF has emerged as a possible new agent for the treatment of psoriasis and other inflammatory diseases. When co-incubated with keratinocytes and tumor cells, it has been shown to inhibit cell proliferation at nontoxic concentrations and induce cell differentiation. To launch into clinical trials, it is required to clarify the mode of action by which Inositol-C2-PAF exerts its beneficial effects. The STAT3 pathway is an important signaling joint in inflammation in general and psoriasis in particular. The aim of this work is to analyze the influence of Inositol-C2-PAF on the STAT3 pathway.

Methods: HaCaT cells, a keratinocyte-derived cell line, were incubated with Interleukin-6 (IL-6), a cytokine that has been proven to be pivotal in psoriasis pathogenesis, and Inositol-C2-PAF. Influences on the STAT3 pathway were analyzed via Western blot, qRT-PCR and immunofluorescence techniques.

Results: It is shown here that Inositol-C2-PAF reduces the total amount of STAT3 and inhibits the activation of STAT3 via phosphorylation. Subsequently, Inositol-C2-PAF inhibits the nuclear localization of STAT3. Consistently, Inositol-C2-PAF also inhibits the expression of genes that are regulated by STAT3, such as the genes for BIRC5, S100A7 and IL-6, which are induced by inflammatory stimuli. It also reduces total intracellular amount of AKT and the activation of AKT via phosphorylation.

Conclusion: Inositol-C2-PAF is a potent inhibitor of the STAT3 pathway on total protein and on activation levels. Thereby, the compound qualifies as a possible new treatment for diseases in which an increased STAT3 activation is pivotal, such as psoriasis. Inositol-C2-PAF reduces the expression of STAT3 regulated genes, such as Survivin and S100A7 that are linked not only to the pathogenesis of psoriasis, but also to various other diseases. It also reduces the expression of IL-6 and might prove a powerful tool in disrupting a detrimental feed-forward loop of IL-6 triggered IL-6 release.

Kurzdarstellung (Deutsch)

Einleitung: Das Alkylphospholipid (APL) Inositol-C2-PAF wurde als mögliche neue Behandlungsoption für entzündliche Erkrankungen wie der Psoriasis identifiziert. In Keratinozyten und Tumorzellen hemmt es in nicht-toxischer Konzentration die Zellproliferation und fördert die Zelldifferenzierung. Um Inositol-C2-PAF im Rahmen klinischer Studien testen zu können, muss zunächst der Wirkmechanismus des APL aufgeklärt werden. Der STAT3-Signalweg nimmt in Entzündungsreaktionen im Allgemeinen und in der Krankheitsentstehung von Psoriasis im Speziellen eine Schlüsselrolle ein. Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den STAT3-Signalweg zu analysieren.

Methoden: HaCaT-Zellen, eine von Keratinozyten abgeleitete Zelllinie, wurden mit Interleukin-6 (IL-6), einem Zytokin, das in der Pathogenese der Schuppenflechte eine entscheidende Rolle spielt, und Inositol-C2-PAF inkubiert. Der Einfluss auf den STAT3-Signalweg wurde mittels Western Blot, qRT-PCR und Immunfluoreszenz analysiert.

Ergebnisse: Inositol-C2-PAF reduziert die absolute intrazelluläre STAT3-Konzentration und inhibiert die Aktivierung von STAT3. Es inhibiert die nukleäre Lokalisation von STAT3 und die Expression von Genen, die sowohl von STAT3 reguliert werden als auch durch inflammatorische Stimuli induziert werden, wie zum Beispiel BIRC5, S100A7 und IL-6. Weiterhin reduziert es die absolute intrazelluläre Konzentration und die Aktivierung von AKT.

Schlussfolgerung: Inositol-C2-PAF ist ein potenter Inhibitor des STAT3-Signalwegs. Dadurch qualifiziert es sich als mögliche neue Behandlungsoption für Erkrankungen, in denen eine pathologisch erhöhte Aktivität des STAT3-Signalwegs eine wichtige Rolle spielt, wie zum Beispiel der Psoriasis. Inositol-C2-PAF reduziert die Expression von Genen, die von STAT3 reguliert werden, beispielsweise BIRC5 und S100A7, die nicht nur mit der Pathogenese der Psoriasis in Verbindung stehen, sondern auch in zahlreichen weiteren Erkrankungen eine Rolle spielen. Weiterhin reduziert es die Expression von IL-6 und könnte sich als hilfreiches Werkzeug erweisen, um schädliche positiv-selbstverstärkende Rückkopplungen aus IL-6 vermittelter IL-6-Freisetzung zu unterbinden.

1. Einführung

„Healthy skin is an effective state of immune tolerance.“

Lowes et al., 2014 [1]

Alkylphospholipide wurden zunächst als sogenannte Anti-Tumor-Lipide entwickelt, um gegen Tumorerkrankungen eingesetzt zu werden. In jüngeren Publikationen trat jedoch zunehmend auch ihr Potential in der Behandlung von solchen Erkrankungen in den Vordergrund, bei denen eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems im Mittelpunkt steht. So wurde eine Anwendung zum Beispiel bei Multipler Sklerose [2] und bei Psoriasis [3] diskutiert. Infolgedessen wurde ihr Potential als Therapie dieser Erkrankungen erforscht und es zeigten sich vielversprechende Ergebnisse. Um die Wirkweise eines der Alkylphospholipide, Inositol-C2-PAF, besser zu verstehen und um diese Stoffe eines Tages in klinischen Studien testen zu können, muss der Mechanismus, durch den es auf Ebene der intra- und extrazellulären Signale wirkt, aufgeklärt werden. Die vorliegende Arbeit soll ihren Teil dazu beitragen, indem sie die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf den STAT3-Signalweg, der insbesondere bei der Pathogenese der Psoriasis eine wichtige Rolle spielt, beleuchtet.

1.1. Psoriasis

Die Psoriasis, auch Schuppenflechte genannt, ist eine chronische Erkrankung, die zumeist mit typischen Hautläsionen einhergeht und durch eine dysfunktionale Aktivierung des Immunsystems gekennzeichnet ist. Beschwerden treten meist in der Adoleszenz oder im frühen Erwachsenenalter erstmalig auf und persistieren oft das gesamte Leben [4]. Es wurden verschiedene Formen der Psoriasis beschrieben. Am häufigsten, in ca. 90% der Fälle, tritt eine *Psoriasis vulgaris* auf. Zahlreiche andere Formen sind beschrieben, zum Beispiel die Psoriasisarthritis, die in seltenen Fällen auch ohne Hautläsionen auftreten kann, oder die *Psoriasis pustulosa* [5]. Wenn in dieser Arbeit in einfacher Form von Psoriasis oder Schuppenflechte die Rede ist, so ist damit stets deren häufigste Manifestation, die *Psoriasis vulgaris*, gemeint.

1.1.1. Symptome der Psoriasis

Die Symptome der Psoriasis rezidivieren häufig und können sich in der Intensität ihres Auftretens deutlich unterscheiden. Das Leitsymptom sind die typischen makulopapulösen Effloreszenzen: Auf gerötetem Grund tritt eine weißlich-silberne Schuppung auf. Die unterliegende Haut erscheint dabei verdickt. Hautläsionen treten meist auf besonders belasteten Hautpartien auf, zum Beispiel um Gelenke, und bevorzugt auf der Extensorenseite [6]. An den Läsionen lässt sich typischerweise das Kerzenwachsphänomen (*signe de la tache de bougie*) beobachten: Bei vorsichtigem Entfernen der Hautschuppen erscheinen diese wie abgeriebenes Kerzenwachs. Unterhalb der Schuppen kommt ein dünnes Häutchen zum Vorschein, dies wird das Phänomen des letzten Häutchens genannt. Entfernt man auch diese Hautschuppe, kommt es zu einer punktförmigen Blutung, dem sogenannten „blutigen Tau“ (Auspitz-Zeichen) [6].

1.1.2. Relevanz der Psoriasis

Ungefähr 25 Millionen Menschen in Europa und Nordamerika, also ca. 2 – 3% der Gesamtbevölkerung, leiden an Schuppenflechte. In Deutschland wären dies bei einer

Prävalenz, die in 2010 und 2011 veröffentlichten Studien mit ungefähr 2,5% angegeben wird, über 2 Millionen Menschen [4, 7, 8]. Das macht Psoriasis zu einer der dermatologischen Erkrankungen mit der höchsten Prävalenz in diesen Regionen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Prävalenz aktuell weiter zunimmt. Ursachen dafür werden in Veränderungen in Bezug auf Lebensstil und auf Umweltbelastungen vermutet [9]. In anderen geographischen Regionen schwankt die Prävalenz von geschätzten 0,9% bis 8,5%, wobei die Schuppenflechte mit zunehmender Entfernung vom Äquator häufiger auftritt [10].

Die bei der Schuppenflechte auftretenden Hauterscheinungen werden von vielen Patienten als stigmatisierend erlebt. Eine Studie aus Großbritannien aus dem Jahr 2009 zeigte, dass sich 62% der an Psoriasis erkrankten Teilnehmenden durch die Erkrankung in ihrer sozialen Interaktion eingeschränkt fühlten und 59% gaben an, dass die Erkrankung ihr Arbeitsleben negativ beeinflusse. Nur 25% stimmten der Aussage zu, dass die Schuppenflechte ihr Sozialleben nicht negativ beeinflusse [11].

Studien belegen auch eine hohe sozioökonomische Bedeutung der Psoriasis [12-14]. In den Vereinigten Staaten von Amerika wurden allein die direkten jährlichen Kosten, die durch die Behandlung von Psoriasis entstehen, auf 1,2 Milliarden US-Dollar geschätzt. Davon entfallen mehr als eine Milliarde US-Dollar, also ca. 84% der Gesamtsumme, auf Ausgaben für Medikamente [15].

In aktuellen Publikationen wird Psoriasis zunehmend als systemische Erkrankung angesehen. Dementsprechend sind die Hautläsionen nur ein Teil eines Krankheitskomplexes und es können mannigfaltige Organbeteiligungen auftreten. Die Beeinträchtigung von Gelenken in Form der Psoriasisarthritis, die bei ca. 30% der Patienten mit Psoriasis auftritt, ist nur ein prominentes Beispiel [16, 17].

Zudem ist bei Patienten mit Psoriasis das Auftreten zahlreicher Ko-Morbiditäten belegt. So tritt zum Beispiel das metabolische Syndrom bei Patienten mit Psoriasis nahezu dreimal häufiger auf als in einer Kontrollgruppe [8].

Die Wahrnehmung von Psoriasis als größerer Krankheitskomplex und als systemische Erkrankung unterstreicht ihre Bedeutung in weiteren pathogenetischen Prozessen. Daher verspricht eine erfolgreiche Behandlung der psoriatischen Hautläsionen auch eine reduzierte Komorbidität und eine Verbesserung der allgemeinen Lebensqualität der Betroffenen.

1.1.3. Pathogenese der Psoriasis

Die Pathogenese der Psoriasis ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Es existieren hierzu zahlreiche wissenschaftliche Modelle und mit jedem Jahr steigt das Wissen um die verschiedenen Prozesse, die zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Krankheit beitragen. Den verschiedenen Formen der Psoriasis, wie z.B. der *Psoriasis vulgaris* oder der *Psoriasis pustulosa*, ebenso wie den verschiedenen Geweben, in denen sich die Erkrankung manifestieren kann, liegen zum Teil unterschiedliche pathogenetische Vorgänge zugrunde.

Betrachtet man die Hautläsionen genauer, zeigen sich in der histologischen Untersuchung folgende typische Merkmale:

- (1) erhöhte Proliferation der Keratinozyten mit dem Resultat einer epidermalen Akanthose
- (2) dilatierte Blutgefäße in der Dermis
- (3) inflammatorische Infiltrate

Bei Patienten, die an Psoriasis leiden, zeigt die nicht von Effloreszenzen betroffene Haut keine der genannten Auffälligkeiten [5]. Wie im Folgenden beschrieben, verflechten sich in komplexen Wechselwirkungen die gestörten und regulären Funktionen der Zellen in Dermis und Epidermis zur Pathogenese der Psoriasis. Um eine Übersicht zu gewinnen, ist es zunächst sinnvoll, die Entstehung psoriatischer Hautläsionen in zwei Phasen einzuteilen: Die Phase der Entstehung und die Phase der Aufrechterhaltung.

1.1.3.1. Phase der Entstehung

In der Entstehung der Psoriasis treffen auslösende Umweltfaktoren auf einen genetisch prädispositionierten (oder permissiven) Organismus.

Die genetische Prädisposition beeinflusst sowohl die Erkrankungswahrscheinlichkeit, als auch den individuellen Verlauf, wie z.B. den Manifestationszeitpunkt oder -ort [18, 19]. Ein gehäuftes familiäres Auftreten wurde bereits 1931 von K. Hoede beschrieben und in weiteren Studien bestätigt [20].

Die auslösenden Faktoren sind zahlreich und lassen sich in lokale Reizfaktoren und systemische Reizfaktoren einteilen. Die isomorphe Reaktion auf eine lokale Reizung wird nach ihrem Erstbeschreiber auch als Köbner-Phänomen bezeichnet [21] und kann nach verschiedenartigen lokalen Reizungen, insbesondere nach physikalischem Trauma, auftreten. Als systemische Reizfaktoren sind unter anderem Infektionen, der Beginn einer Medikation, zum Beispiel mit Lithium, Betablockern oder Malaria-Therapeutika, und der Glukokortikoidentzug bekannt [22].

Aktuelle Modelle zur Entstehung der Psoriasis gehen davon aus, dass diese auslösenden Faktoren in einem genetisch permissiven Organismus zu der Freisetzung von Antigenen führen. Ein solches Antigen ist zum Beispiel LL37, ein antimikrobielles Peptid, das vermutlich von Keratinozyten in der Epidermis und neutrophilen Granulozyten in der Dermis freigesetzt wird [23]. Diese Antigene wiederum aktivieren dendritische Zellen der Dermis.

Die aktivierten dendritischen Zellen produzieren verschiedene Zytokine, unter anderem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukine- (IL-) 6 und 23 und Interferone- (IFN-) α und β [24, 25]. Insbesondere IL-6 führt in naiven T-Helfer-Zellen über den STAT3-Signalweg zur Expression von IL-23-Rezeptoren und zur Polarisierung dieser Zellen in Th17-Zellen [24, 26]. In zahlreichen aktuellen Publikationen wird die Aktivierung und Differenzierung von Th17-Zellen in der Haut als Grundlage der Entstehung psoriatischer Läsionen angesehen.

Die teilweise sehr guten Ergebnisse, die bei der Therapie mit TNF- α -Inhibitoren beobachtet werden können, lassen darauf schließen, dass TNF- α in der Pathogenese der Psoriasis eine Schlüsselrolle spielt. Dementsprechend wurde in psoriatischen Läsionen eine erhöhte Konzentration von TNF- α beobachtet [27, 28]. TNF- α wird normalerweise von Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten produziert. Seine Biosynthese kann aber auch in anderen Zellen der Haut stimuliert werden, zum Beispiel in Fibroblasten und Keratinozyten [29-31]. TNF- α hat als Signalmolekül unter anderem Einfluss auf Inflammation, Immunabwehr, Zellwachstum und -differenzierung sowie Geweberegeneration. Zu seinen physiologischen Funktionen gehört die Rekrutierung von Leukozyten an Orte der Infektion, die Initiation der Apoptose und die Stimulation der Produktion von Akute-Phase-Proteinen. Auf molekularer Ebene erhöht TNF- α den Abbau der I- κ B-Kinase (IKK), einem Inhibitor des NF κ B-Signalwegs, wodurch es die Aktivität von NF κ B erhöht. Dieses wiederum führt zu einer gesteigerten Produktion der Zytokine TNF- α und IL-6 sowie der Rezeptoren ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin. Dadurch

stimuliert es eine entzündliche Reaktion des Gewebes und ruft eine autokrine und parakrine selbstverstärkende Reaktion hervor. TNF- α induziert die Differenzierung von Monozyten und dendritischen Zellen [32] und bedingt ihre Reifung [33]. In der Dermis fördert TNF- α sowohl die Angiogenese als auch die Rekrutierung von Immunzellen [3]. In Keratinozyten stimuliert TNF- α die Transkription proinflammatorischer Genprodukte und hat eine starke additive und synergistische Wirkung mit anderen proinflammatorischen Zytokinen [34-36]. Über diese Mechanismen spielt TNF- α gerade in der Phase der Entstehung psoriatischer Läsionen eine entscheidende Rolle.

1.1.3.2. Phase der Aufrechterhaltung

Für die Aufrechterhaltung der Krankheitsaktivität in den psoriatischen Hautläsionen wird in der vorliegenden Arbeit das folgende 7-Schritt-Modell vorgeschlagen (Abbildung 1). Die einzelnen Schritte sind durch eine hohe Interkonnektivität auf allen Ebenen gekennzeichnet. Das vereinfachte Modell soll nicht suggerieren, dass die Pathogenese der Psoriasis stets einem uniformen oder linearen Ablauf folgt; es dient vielmehr dem besseren Verständnis der äußerst komplexen Verflechtungen.

Vereinfachtes 7-Schritt-Modell der Aufrechterhaltung psoriatischer Läsionen:

- (1) erhöhte Konzentration von IL-6
- (2) Inhibition von regulatorischen T-Zellen durch IL-6
- (3) unregulierte Aktivität der Th1- und Th17-Zellen
- (4) Stimulierung dendritischer Zellen durch Th1-Zellen
- (5) Aktivierung von Th17-Zellen durch dendritische Zellen
- (6) Stimulierung von Keratinozyten durch dendritische Zellen
- (7) Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Keratinozyten

Schritt (1): Erhöhte Konzentration von IL-6

IL-6 kann in nahezu allen Stroma- und Immunzellen produziert werden. In psoriatischen Hautläsionen wird das Zytokin in der Dermis hauptsächlich durch dendritische Zellen und Endothelzellen produziert [37, 38]. In der Epidermis der Läsionen produzieren Keratinozyten erhöhte Konzentrationen von IL-6 [39].

Schritt (2): Inhibition von regulatorischen T-Zellen durch IL-6

Gesund Haut basiert auf einer Toleranz des Immunsystems durch kontinuierliche Unterdrückung der Aktivität von T-Gedächtnis- und T-Effektorzellen durch regulatorische T-Zellen [1, 40]. Interleukin-6 inhibiert die suppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen [37] und ist als entscheidender Faktor an der Beendigung des Zustands der Toleranz beteiligt.

Schritt (3): Unregulierte Aktivität der Th1- und Th17-Zellen

Sobald die Suppression von regulatorischen T-Zellen inhibiert wird, ist die Homöostase der Immunzellen der Haut unterbrochen. Es resultiert eine erhöhte Aktivität der Th1- und Th17-Effektor- und Gedächtniszellen [40].

Schritt (4): Stimulierung dendritischer Zellen durch Th1-Zellen

Aktiviert Th1-Zellen sezernieren TNF- α und IFN- γ [41, 42]. IFN- γ wiederum aktiviert dendritische Zellen [25]. Hier schließt sich ein Kreis zur Entstehung psoriatischer Hautläsionen, da aktivierte dendritische Zellen zur Entstehung des für Psoriasis typischen Zytokinmilieus beitragen (siehe Abschnitt (A) Phase der Entstehung).

Schritt (5): Aktivierung von Th17-Zellen durch dendritische Zellen

Wenn dendritische Zellen aktiviert werden, produzieren sie neben zahlreichen anderen Zytokinen (siehe oben) auch Interleukin-1 und Interleukin-23 [25]. Diese Zytokine aktivieren bei gleichzeitiger Inhibition der Suppression (siehe Schritt (3)) wiederum Th17-Zellen [25, 43].

Schritt (6): Stimulierung von Keratinozyten durch dendritische Zellen

Aktivierte Th17-Zellen produzieren verschiedene Zytokine, allen voran die namensgebenden IL-17A und IL-17F, zudem aber auch IL-6, TNF- α und weitere Interleukine [44-46]. Diese Zytokine wirken an Keratinozyten indem sie die Proliferation fördern und die Differenzierung hemmen [47, 48]. In der hyperplastischen Epidermis zeigen die Keratinozyten eine reduzierte Expression von Differenzierungsmarkern [5].

Schritt (7): Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Keratinozyten

Interleukin-17 (IL-17) und Interleukin-22 (IL-22) sind proinflammatorische Zytokine, denen in zahlreichen Publikationen eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Psoriasis zugeschrieben wird [49]. IL-17 und IL-22 werden, genauso wie IL-6, unter anderem von Th17-Zellen produziert [50]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-22 mit der Erkrankungsschwere korreliert [51]. IL-17 stimuliert Keratinozyten und führt nicht nur zu deren gesteigerten Proliferation, sondern induziert zudem die Produktion und Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-6, IL-36 und TNF- α [52, 53]. Zudem sezernieren die aktivierten Keratinozyten vermehrt Chemokine wie zum Beispiel CCL20, die die Migration von T-Zellen und dendritischen Zellen in die Hautläsionen induzieren und damit die proinflammatorische Signalkette aufrechterhalten. Eine Reihe von Signalmolekülen, die in der Epidermis produziert werden, diffundieren zudem in die Dermis und fördern dort die Angiogenese und die Permeabilität der Gefäße [54].

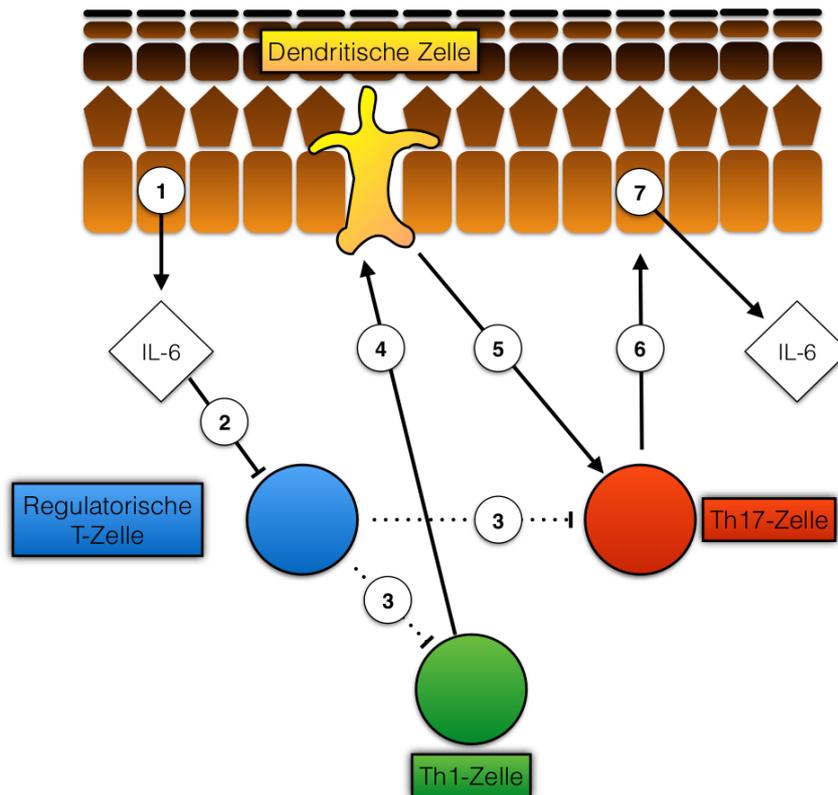


Abbildung 1: Vereinfachtes 7-Schritt-Modell der Aufrechterhaltung psoriatischer Läsionen.

Die Pathogenese psoriatischer Hautläsionen kann in eine Phase der Entstehung und eine Phase der Aufrechterhaltung eingeteilt werden. Hier wird ein vereinfachtes 7-Schritt-Modell für die Aufrechterhaltung psoriatischer Läsionen vorgeschlagen: (1) In psoriatischen Läsionen wird Interleukin-6 (IL-6) in erhöhter Konzentration freigesetzt. (2) IL-6 inhibiert die Aktivität der regulatorischen T-Zellen, wodurch (3) die Hemmung von Th1- und Th17-Zellen entfällt. (4) Th1-Zellen stimulieren dendritische Zellen. (5) Dendritische Zellen aktivieren Th17-Zellen. (6) Th17-Zellen stimulieren Keratinozyten. (7) Keratinozyten produzieren proinflammatorische Zytokine.

1.1.4. *In vivo*- und *in vitro*-Modelle

Eine spontane Pathogenese der Psoriasis tritt ausschließlich beim Menschen auf. Daher ist es eine Herausforderung für Wissenschaftler, ein künstliches *in vivo*- oder *in vitro*-Modell zu erschaffen, um Psoriasis in Tieren oder in der Zellkultur zu simulieren.

Die Erschaffung von *in vivo*-Modelle für Psoriasis kann auf verschiedene Weise ermöglicht werden, zum Beispiel durch

- (1) eine Xenotransplantation von menschlicher Haut auf Tiermodelle [55, 56], oder
- (2) die Irritation der Haut von Versuchstieren durch chemische [57] oder physikalische [58] Mittel, oder
- (3) Gen-Knockout und Transgenetik [59-61].

In vivo-Modelle haben dabei den großen Vorteil, dass nicht nur eine limitierte Teilmenge der Zelltypen simuliert werden, zum Beispiel nur Keratinozyten und Fibroblasten, sondern die gesamte Fülle an Zellen, die lebende Organismen bieten.

Zur Erstellung eines *in vitro*-Modells wurden beispielsweise primäre [34, 62, 63] oder immortalisierte [64] Keratinozyten in Zellkultur gebracht. Es wird angenommen, dass durch die Verwendung primärer Keratinozyten der tatsächliche Zustand in psoriatischen Hautläsionen besser nachgestellt werden kann, allerdings ist die Extraktion aufwändig, die Überlebenszeit kurz und insbesondere ist die Reproduzierbarkeit von Experimenten eingeschränkt, da individuelle Proben sich aufgrund der Spendervariabilität in ihrer Zellkomposition, im Zytokingehalt und in weiteren Charakteristika unterscheiden können. Mit unterschiedlichen Techniken konnten Keratinozyten immortalisiert werden und es entstanden die Zellreihen NM1 [65], HaCaT [66] und NIKS [67]. Die immortalisierten Keratinozyten können für mehrere Passagen verwendet werden und erlauben eine deutlich verbesserte Standardisierung im Vergleich zu primären Zellen. Allerdings entstehen die immortalisierten Zellreihen durch genetische Mutationen [66, 68] und ebendiese genetische Abweichungen könnten möglicherweise auch die Antwort der Zellen auf psoriatische Stimuli beeinflussen.

Zur Simulierung eines psoriatischen Hautmilieus erfolgt die Stimulierung der in Zellkultur gebrachten Zellen mit solchen Zytokinen, die mit der Pathogenese der Psoriasis in Verbindung gebracht werden. Dabei wird sowohl mit einzelnen Zytokinen [62], als auch mit einer Zusammenstellung mehrerer Zytokine gearbeitet [34, 63, 64].

1.1.5. Behandlung der Psoriasis

Bis heute existiert noch keine Therapie, die eine vollständige Heilung der Psoriasis ermöglicht. Eine (spontane) Krankheitsremission ist möglich und tritt Schätzungen zufolge ungefähr bei einem Drittel aller Patienten auf. Bisher war es allerdings nicht möglich, Remissionen einer bestimmten Therapie zuzuschreiben [69].

Es existieren zahlreiche Medikamente zur Symptomlinderung. Als Überblick können die jeweils aktuellen Leitlinien der AWMF, der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V., konsultiert werden. Diese Leitlinien stellen das höchste Maß an wissenschaftlicher Zuverlässigkeit in Deutschland dar und beziehen sich in ihren Ausführungen auf zahlreiche Studien und Metaanalysen. Die folgenden Informationen sind der aktuellen Version der Leitlinie von 10 / 2017 entnommen [70].

Zur Objektivierung der Krankheitsintensität und demzufolge zur Therapieauswahl existieren zahlreiche Bewertungssysteme. Häufig verwendet sind die BSA-, PASI- und DLQI-Systeme.

BSA steht für Body Surface Area und beschreibt den Anteil der Körperoberfläche, der von Psoriasis betroffen ist, und wird in Prozent angegeben. Bei einem BSA von $\leq 10\%$ spricht man von einer leichten Erkrankung.

PASI steht für Psoriasis Area and Severity-Index und beschreibt das betroffene Gebiet und die Symptomschwere. Bei einer Punktschwere von ≤ 10 spricht man von einer leichten Erkrankung. Die Effektivität einer Therapie wird häufig im PASI 75-System wiedergegeben. Dabei wird der Anteil an Personen ermittelt, deren PASI durch die Anwendung einer bestimmten Arznei um mindestens 75% reduziert wurde.

Der Dermatologische Lebensqualitäts-Index (DLQI) beschreibt die Einschränkung der Lebensqualität. Auch beim DLQI spricht man bei einer Punktschwere von ≤ 10 von einer leichten Erkrankung.

1.1.5.1. Aktuelle Behandlungsoptionen

Eine Basistherapie findet bei der *Psoriasis vulgaris* stets als wirkstofffreie lokale Salbentherapie statt. Diese kann Zusätze von Harnstoff oder Salicylsäure enthalten. Die wirkstoffbasierte Therapie wird bei leichten Formen der Psoriasis lokal und bei mittleren und schweren Formen zusätzlich systemisch eingesetzt.

Weiterhin wird bei mittleren und schweren Formen häufig zusätzlich eine Phototherapie mit Licht aus dem UVA- und UVB-Spektrum mit unterschiedlicher Wellenlänge eingesetzt. Dabei erzielt die Phototherapie mit zahlreichen wirkstoffbasierten Therapien synergistische Effekte. Einer sehr guten Wirksamkeit bei geringen Kosten stehen der hohe Zeitaufwand für Patienten sowie ein potentiell kanzerogenes Risiko gegenüber.

Tabellen 1 und 2 fassen die gängigen Therapeutika anhand der AWMF-Leitlinie zusammen. Bei einer Bewertung der Wirkstoffe müssen Wirksamkeit, Anwendungssicherheit, Praktikabilität sowie die Kosten-Nutzen-Relation einbezogen werden.

Gerade die bei schwereren Formen angewendete systemische Therapie ist gekennzeichnet durch ein breites Spektrum an unerwünschten Arzneimittelwirkungen sowie teilweise sehr hohe Kosten – bei den in der Wirksamkeit am besten bewerteten Medikamenten bis zu 30 000 € pro Jahr und Patient.

Tabelle 1: Lokal anzuwendende Arzneimittel zur Behandlung der Psoriasis.

Arzneimittel (-gruppe)	Wirkmechanismus	Geschätzte Wirksamkeit	Besonderheit	Wichtigste unerwünschte Arzneimittelreaktionen	Geschätzte Kosten pro Monat
Calcineurin-inhibitoren	reduzierte T-Zell-Autostimulation durch reduzierte Zytokinproduktion	gut	nur Off-Label-Einsatz	Brennen der Haut, Brennen der Haut, Hautinfektionen, potentiell karzinogen	ca. 400 €
Dithranol	reduzierte Proliferation von Keratinozyten und Freisetzung von Zytokinen	sehr gut	Instabilität (Oxidation)	Hautirritation, Färbung von Haut und Kleidung	65 €
Glukokortikosteroide	Regulation der Genexpression, Immunsuppression	sehr gut		Hautatrophie, Risiko einer Superinfektion	40 €
Steinkohleteer	ungeklärt	mäßig	erhöht evtl. die Effektivität von UV-Be-strahlungen, Wirksamkeit nicht abschließend geklärt	potentiell karzinogen, abstoßende Farbe und Geruch	140 €
Tazaroten	verminderte Expression von Entzündungsmediatoren, verminderte epidermale Proliferation	gut	evtl. teratogen, geht evtl. in Muttermilch über	Juckreiz, Erythem	nicht in Deutschland vertrieben
Vitamin D3-Derivate	Regulation der Genexpression, reduzierte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, erhöhte Produktion anti-inflammatorischer Zytokine	sehr gut		Pruritus	80 - 240 €

Modifiziert und ergänzt aus: S3 - Leitlinie zur Therapie der *Psoriasis vulgaris*, Appendix: „Topische Therapie, Phototherapie, Sonstige Therapien, Schnittstellendefinition“, Fortbestand der Empfehlungen vom Update 2011, www.awmf.org [70]

Tabelle 2: Systemisch wirksame Arzneimittel zur Behandlung der Psoriasis.

Arzneimittel (-gruppe)	Wirkmechanismus	Wirksamkeit	Besonderheit	Wichtigste unerwünschte Arzneimittelreaktionen	Geschätzte Kosten pro Jahr (1. Jahr)
Acitretin	Retinoid, hemmt epidermale Proliferation, Immunmodulation in der Dermis	mäßig		Cheilitis, Teratogenität, weitere [71]	1 500 €
Adalimumab	Antikörper gegen TNF- α	sehr gut	Langzeittherapie möglich	Blutbildveränderungen, Autoantikörperbildung, Malignome	24 000 €
Apremilast	Phosphodiesterase-hemmer, verminderte Freisetzung von TNF- α	mäßig	Abbau über CYP3A4	Diarrhoe, Übelkeit, Suizidalität	17 000 €
Ciclosporin	Calcineurininhibitor, Inhibition der NFAT-abhängigen Zytokinproduktion	mäßig	zahlreiche Medikamenteninteraktionen, Langzeittherapie möglich	zahlreiche, u.a. Nephrotoxizität, Hypertonie, evtl. Karzinogenität	5 800 €
Etanercept	Bindung von TNF- α	gut	Langzeittherapie möglich	Blutbildveränderungen, Autoimmunprozesse	22 000 – 28 000 €
Fumarsäure-ester	Immunmodulation	mäßig	Langzeittherapie möglich	gastrointestinale Beschwerden, Blutbildveränderungen	3 300 €
Infliximab	Antikörper gegen TNF- α	hervorragend	Langzeittherapie möglich	Injektionsreaktion, anaphylaktoide Reaktion oder Angioödem	25 000 – 30 000 €
Methotrexat	Folsäure-Antagonismus, reduzierte epidermale Proliferation	mäßig	Zahlreiche Arzneimittelinteraktionen, Therapie erfordert Überwachung	Schwere Reaktionen möglich, u.a. Leberfibrose und -zirrhose, Myelosuppression, Pneumonitis und Lungenfibrose	100 € (p.o.) 1 300 € (s.c.)
Secukinumab	Antikörper gegen IL-17A	hervorragend		Candida-Infektionen	30 000 €
Ustekinumab	Antikörper gegen IL-12 und IL-23	sehr gut		Erhöhtes Risiko milder Infektionen	25 000 €

Modifiziert und ergänzt aus: S3 - Leitlinie zur Therapie der *Psoriasis vulgaris*, Update 2017, www.awmf.org [70]

1.1.5.2. Neuartige und zukünftige Therapieoptionen

Obwohl aktuell zahlreiche unterschiedliche Behandlungsmöglichkeiten existieren, ist in der aktuellen Leitlinie eingangs zu lesen, dass „die aktuelle Versorgung der Patienten [...] zu einer geringen Zufriedenheit der Patienten mit ihren Therapien“ führe. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass alle bekannten Wirkstoffe nur bei einem Teil der Patienten eine ausreichende Wirksamkeit zeigen. Daher gibt es viele Patienten, die mit den zur Verfügung stehenden Mitteln trotz mehrmaliger Therapieadaptierung keine Linderung erreichen und es besteht weiterer Forschungsbedarf.

In der Vergangenheit wurden mehrere TNF- α -Inhibitoren entwickelt und für die klinische Anwendung zur Therapie der Psoriasis zugelassen. Einige dieser Wirkstoffe zeigten eine sehr gute Wirksamkeit. TNF- α -Inhibitoren standen zu Beginn im Verdacht, das Risiko schwerer Infektionen zu erhöhen. Weiterhin gilt, dass Patienten vor Beginn einer Therapie auf eventuell vorliegende Infektionen, wie zum Beispiel Tuberkulose oder invasive Pilzkrankungen, untersucht werden müssen. Unter Beachtung dieser Vorsichtsmaßnahmen zeichnet die Studienlage ein heterogenes Bild. In der Zusammenschau lassen zwei große Metaanalysen vermuten, dass die alleinige Therapie mit TNF- α -Inhibitoren kein erhöhtes Risiko für schwere Infektionen bedingt [72], während eine Kombination mit anderen immunsuppressiven Arzneimitteln zu einem signifikant erhöhten Risiko für schwere Infektionen und der Entwicklung maligner Neoplasien führt [73]. Weiterhin wurde beobachtet, dass nach der Beendigung einer Therapie mit TNF- α -Inhibitoren häufig ein zeitnahes Rezidiv auftritt [74]. Davon abgesehen zeigen TNF- α -Inhibitoren ein günstiges Nebenwirkungsprofil. Allerdings erreichen auch diese Arzneien nur bei einem Teil der Patienten eine zufriedenstellende Wirksamkeit, zum Beispiel hat Etanercept einen PASI 75 von schätzungsweise 30 - 50% [75].

Eine weitere neuartige Entwicklung ist Ustekinumab, ein Antikörper gegen p40, das eine Untereinheit sowohl von IL-12 als auch von IL-23 ist. Daher wirkt Ustekinumab gegen beide in der Pathogenese der Psoriasis relevanten Zytokine [76]. IL-12 aktiviert Th1-Zellen, diese wiederum stimulieren in dendritischen Zellen die Produktion von IL-23. Dieses Interleukin aktiviert Th17-Zellen, welche in Folge psoriatische Veränderungen in Keratinozyten fördern. Die Wirksamkeit der Arznei wurde in klinischen Studien belegt [77,

78]. Seit 2009 ist Ustekinumab von der Europäischen Arzneimittelagentur zur Behandlung der Psoriasis zugelassen.

Nach der indirekten Inhibition der Th17-Zellen ist der nächste logische Schritt in der Arzneimittelentwicklung eine direkte Inhibition der Th17-Zellen und ihrer Wirkung auf Keratinozyten. Dieser Rationale folgend wurden Antikörper gegen IL-17 entwickelt. Die erste derartige in Europa zugelassene Arznei ist Secukinumab [79], ähnliche in Entwicklung beziehungsweise auf dem Weg der Zulassung befindliche Antikörper sind Brodalumab [80] und Ixekizumab [81]. Diese Antikörper zeigten im Rahmen von Studien eine vielversprechende Wirksamkeit. So konnte zum Beispiel Brodalumab bei 42% der Studienteilnehmenden einen PASI 100 erreichen [82]. Trotz des insgesamt günstigen Nebenwirkungsprofils ist jedoch die Anwendung von Arzneien dieser Gruppe nicht frei von Risiken. So warnt zum Beispiel die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft davor, dass Antikörper gegen Interleukin-17 chronisch entzündliche Darmerkrankungen verschlechtern oder eventuell sogar hervorrufen könnten [83].

Eines der Kennzeichen der Psoriasis ist eine verstärkte Angiogenese, die durch die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) hervorgerufen werden können [84]. Die Genexpression von VEGF ist dementsprechend in psoriatischen Hautläsionen erhöht [54]. Bevacizumab ist ein Antikörper gegen VEGF und wurde bereits für seine Wirksamkeit bei der Behandlung solider Tumore getestet [85]. Seit 2005 ist Bevacizumab durch die Europäische Arzneimittelagentur für die Behandlung von Krebserkrankungen in fortgeschrittenen Stadien zugelassen [86] und wird in der Augenheilkunde erfolgreich im Off-Label-Use gegen neovaskuläre Veränderungen eingesetzt [87]. Als Zufallsbefund einer Therapie mit Bevacizumab wurde eine Besserung einer Psoriasis beobachtet, die nach Absetzen des Medikaments rezidierte [88]. Eine klinische Anwendung zur Therapie der Psoriasis ist daher auch für dieses Medikament theoretisch möglich.

Zahlreiche intrazelluläre Signalwege sind verantwortlich für eine proinflammatorische Antwort und könnten daher Ziel einer Therapie der Psoriasis sein. Allerdings stehen nur wenige davon in einer Schlüsselposition innerhalb der komplexen Signalkaskaden. Einer dieser Schlüsselwege ist der JAK-STAT-Signalweg, der im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben wird. Die pharmazeutische Anwendung einer Hemmung des JAK-STAT-Signalwegs ist Gegenstand der aktuellen Forschung [89].

1.2. STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription

Die Familie der „Signal Transducer and Activator of Transcription“- (STAT-) Proteine wurde in den frühen 1990er Jahren entdeckt [90, 91]. STATs bestehen aus ungefähr 750 bis 850 Aminosäuren und vermitteln Signale von der Plasmamembran zum Zellkern. Im inaktivierten Zustand befinden sie sich meist im Zytoplasma [92]. Nach ihrer Aktivierung werden STATs in den Zellkern verlagert und regulieren dort die Transkription verschiedener Gene. Dadurch beeinflussen sie Differenzierung, Zellwachstum, Abwehrmechanismen, Homöostase und Onkogenese [93].

Es wurden bislang bei Säugetieren sieben verschiedene STATs beschrieben, die alle strukturelle und funktionale Gemeinsamkeiten aufweisen: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6.

1.2.1. STAT-Domänen

Allen STATs sind fünf strukturell und funktionell konservierte Domänen gemeinsam (siehe Abbildung 2). Von der amino-terminalen (NH₂-) Domäne wird angenommen, dass sie die Bindung an Gamma-Activated Site (GAS)-Enhancer und / oder die Interaktion mit transkriptionellen Co-Aktivatoren vermittelt [94, 95]. Die Coiled-Coil-Domäne (CCD) spielt vermutlich für die Bindung an Rezeptoren, die Tyrosinphosphorylierung, den nukleären Export und die Interaktion mit weiteren Proteinen eine Rolle [96, 97]. Die DNA-bindende Domäne (DBD) befindet sich im Zentrum des Moleküls. Die Linker-Domäne verbindet die DNA-bindende Domäne mit der Src-homology 2 (SH₂)-Domäne. Die SH₂-Domäne kann an bestimmte Phosphotyrosinseitenketten binden. Sie vermittelt die Rekrutierung von STATs an Zytokinrezeptoren, die Assoziierung mit den aktivierenden JAKs und die Dimerisierung der STAT-Monomere [98, 99]. Die carboxy-terminale, transkriptionsaktivierende Domäne (TAD) unterscheidet sich in den sieben verschiedenen STATs voneinander, trägt zur Spezifität der STATs bei und ist hauptverantwortlich für die unterschiedliche Polypeptidlänge der STATs [93]. Sie ist für die Funktion der STATs essentiell [100]. Eine Phosphorylierung von Serin-Seitenketten, bei den meisten STATs an Position 727 (S727), und von Tyrosin-Seitenketten (siehe unten) innerhalb der TAD kann die transkriptionelle Aktivität beeinflussen [101].

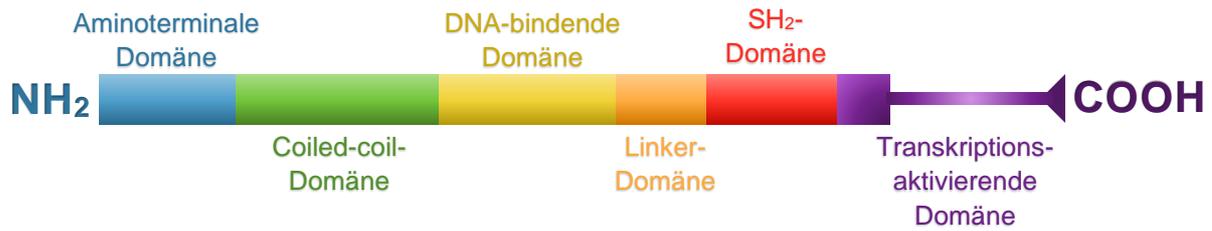


Abbildung 2: Domänen der STATs.

In der Grafik sind die dargestellten Längen annähernd repräsentativ für die Anzahl der Aminosäureseitenketten. Die transkriptionsaktivierende Domäne (TAD) variiert in ihrer Länge bei den verschiedenen STAT-Molekülen. Modifiziert nach [92].

1.2.2. Aktivierung der STATs

STATs werden durch eine Phosphorylierung ausgewählter Tyrosinseitenketten aktiviert. Bei STAT3 ist die Aktivierungsstelle die C-terminale Tyrosinseitenkette 705 (Y705) innerhalb der transkriptionsaktivierenden Domäne (TAD) [102].

Um STATs zu aktivieren, werden extrazelluläre Signale mithilfe von Rezeptoren über die Plasmamembran geleitet. Alle Interferone, die meisten Interleukine, zahlreiche Wachstumsfaktoren und einige Hormone können STATs aktivieren [103]. Die Aktivierung erfolgt entweder durch Tyrosinkinassen (TKs) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Tyrosinkinassen können in Rezeptor-TKs und zytosolische TKs eingeteilt werden.

1.2.3. Aktivatoren der STATs

Ein prominentes Beispiel der zytosolischen TKs, die STATs aktivieren, ist die Familie der Januskinasen (JAKs). JAKs können durch verschiedene Rezeptoren wie zum Beispiel durch Glykoprotein (Gp)130 aktiviert werden (siehe Kapitel 1.2.3.1). Andere zytosolische TKs, die STATs aktivieren, sind Src und ABL [104].

Ein prominentes Beispiel der Rezeptor-TKs, die STATs aktivieren, ist der Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR). Der EGFR ist ein Vertreter der Familie der menschlichen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (Human epidermal growth factor-Rezeptor (HER)). Weitere Mitglieder der HER-Familie sind ErbB2/HER-2,

ErbB3/HER-3 und ErbB4/HER-4. Alle Familienmitglieder besitzen eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität [105]. Neben dem Ras-Raf-MAPK-Signalweg kann EGFR auch weitere Signalkaskaden aktivieren, wie zum Beispiel die Src-, PLC-, PI3K- und JAK-Signalwege [106].

Weitere Aktivatoren der STATs sind Ras homologue (Rho)-GTPasen. Zur Gruppe der Rho-GTPasen gehören unter anderem Rho, Rac und Cdc42. Eine Unterdrückung der Expression von Rac hat eine Inhibition der EGF-abhängigen Aktivierung von STAT3 zur Folge [107]. Rac stimulierte zudem die Translokation von STAT3 in den Nukleus. Dabei gab es Hinweise darauf, dass Rac indirekt über eine autokrine Produktion von Interleukin-6 auf STAT3 wirkt [108]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Rho eine Aktivierung von STAT3 unabhängig von einer autokrinen Stimulation mit IL-6 induzieren kann [109].

1.2.3.1. Gp130-vermittelte Signaltransduktion

An der Pathogenese der Psoriasis sind zahlreiche Zytokine beteiligt. In dem zuvor vorgestellten 7-Schritt-Modell der Aufrechterhaltung psoriatischer Läsionen (siehe Kapitel 1.1.3) steht IL-6 im Mittelpunkt. Das extrazelluläre Signal von IL-6 wird unter Mitwirkung von Gp130 in ein intrazelluläres Signal übersetzt. Gp130, auch bekannt unter der Bezeichnung „Interleukin-6-Signal-Transducer“ (IL6ST), fungiert als Untereinheit von Zytokinrezeptoren. In hetero-oligomeren Rezeptoren wird die Untereinheit, die das Zytokin bindet, oft als α -Untereinheit und die Untereinheit, die das Signal über die Zellmembran vermittelt, meist als β -Untereinheit bezeichnet. Gp130 ist die β -Untereinheit eines Teils der Typ I-Zytokinrezeptoren. Es dimerisiert oder polymerisiert mit anderen Rezeptoruntereinheiten, um einen vollständigen Rezeptorkomplex zu bilden. Zum Beispiel kann Gp130 mit dem Interleukin-6-Rezeptor (IL6R) als α -Untereinheit dimerisieren, um einen vollständigen IL-6-Rezeptorkomplex zu formen. Zudem ist Gp130 an der Signaltransduktion von IL-11, LIF, OSM, CNTF und Cardiotropin I beteiligt. In der Abwesenheit eines komplementären Liganden aktiviert Gp130 die nachfolgende Signalkaskade nicht [110-114].

Die Typ I- und Typ II-Zytokinrezeptoren besitzen keine intrinsische Kinaseaktivität. Sie sind von der Rekrutierung von assoziierten Tyrosinkinasen abhängig, um die nachfolgende Signalkaskaden zu initiieren [115, 116].

1.2.3.2. *Januskinasen*

Bei Säugetieren sind vier Mitglieder der Familie der Januskinasen beschrieben: Die Januskinasen 1 bis 3 (JAK1, JAK2, JAK3) und die Tyrosinkinase 2 (TYK2). Dabei handelt es sich um zytoplasmatische Tyrosinkinasen, die an Prolin-reiche membrannahe Domänen der Zytokinrezeptoren binden [117]. Gp130 hat als Teil des Zytokinrezeptors keine intrinsische Kinaseaktivität und bindet reversibel Tyrosinkinasen wie z.B. die Januskinasen [110]. Infolge einer Dimerisierung der Rezeptoren nähern sich zwei JAKs an. Durch diese Apposition können sich die beiden Kinasen durch Transphosphorylierung gegenseitig aktivieren [118]. Die Transphosphorylierung induziert die intrinsische katalytische Aktivität der Kinasen. Aktivierte JAKs phosphorylieren daraufhin spezifische Tyrosinseitenketten der Rezeptoren. Proteine, die ein Polypeptidmuster entsprechend der Src-Homologiedomäne-2 (Src homology 2, SH2) aufweisen, wie zum Beispiel die Gruppe der STATs, können an diese Phosphotyrosin-Seitenketten binden. Anschließend können JAKs die rekrutierten STATs an einer Tyrosinseitenkette phosphorylieren [92]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Signaltransduktion über Gp130 für die Wirkung von STAT3 auf Zelldifferenzierung und -proliferation entscheidend ist [119, 120].

Es wurde gezeigt, dass der JAK-STAT-Signalweg für zahlreiche Auswirkungen der IL-6-abhängigen intrazellulären Antwort essentiell ist. STAT3-defiziente Mäuse sowie STAT3-null-Keratinocyten weisen Defekte in ihrer Fähigkeit auf, auf einen IL-6-Stimulus zu reagieren [121-124]. Dennoch ist dies nicht der einzige Signalweg, durch den Gp130 seine Funktion ausübt. Die differentielle Aktivierung weiterer Signalwege, wie zum Beispiel den RAS-MAPK-, PI3K- und AKT-Signalwegen, führt wahrscheinlich zu einer unterschiedlichen intrazellulären Antwort auf die Bindung verschiedener Zytokine [125].

1.2.3.3. *Interleukin-6*

IL-6 ist der Prototyp der Zytokin-Unterfamilie, die auch IL-11, LIF, CT-1, OSM, CTNF und NNT-1/BSF-3 beinhaltet, die sich alle in Struktur und Funktion ähnlich sind [126, 127]. IL-6 wird als Signalmolekül in gesunder menschlicher Haut exprimiert und kann in basalen Keratinozyten, in dendritischen und endothelialen Zellen sowie in vielen anderen Zellen nachgewiesen werden. IL-6 spielt bei der Entstehung von Psoriasis eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.1.3). Erhöhte Spiegel von IL-6 wurden in psoriatischen

Hautläsionen und im Serum von Patienten mit Psoriasis gefunden [38, 39]. IL-6 hat zahlreiche verschiedene Funktionen. Zu den für die Entstehung der Psoriasis relevantesten zählt die Aktivierung von Zellen des Immunsystems [128-130]. Es stimuliert die Polarisierung von naiven Th-Zellen in Th17-Zellen und kann deren Suppression durch regulatorische T-Zellen inhibieren [131-133]. Dies ist besonders bedeutend, da eine Dysfunktion von regulatorischen T-Zellen und eine erhöhte Aktivität von T-Effektorzellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der psoriatischen Läsionen spielen [134, 135]. Die Expression von IL6R α und Gp130 ist in T-Zellen aus psoriatischem Gewebe signifikant erhöht, was auf eine erhöhte Disposition zur Signaltransduktion schließen lässt [37]. IL-6 wirkt zudem als Wachstumsfaktor für Keratinozyten [38, 126]. Das Zytokin kann seine eigene Produktion in Monozyten induzieren und so einen positiv-selbstverstärkenden Kreislauf in Gang setzen [39].

Nachdem IL-6 an den IL6R bindet, formt dieser ein Heterodimer mit Gp130 [136]. Dabei unterscheidet man das klassische und das trans-signaling-Modell. Im klassischen Modell bindet IL-6 an den extrazellulären Anteil des IL6R, die beiden wiederum an Gp130. Im trans-signaling-Modell bindet das Zytokin an lösliche IL6R (soluble IL6R, sIL6R) und kann dann auch an solchen Zellen an Gp130 binden, die selbst IL6R nicht exprimieren. Nachdem der Komplex aus IL-6 und IL6R an Gp130 gebunden hat, dimerisieren zwei derartige Trimere und lösen eine intrazelluläre Signaltransduktion aus. Die Signaltransduktion von IL-6 über STAT3 ist in Abbildung 3 dargestellt.

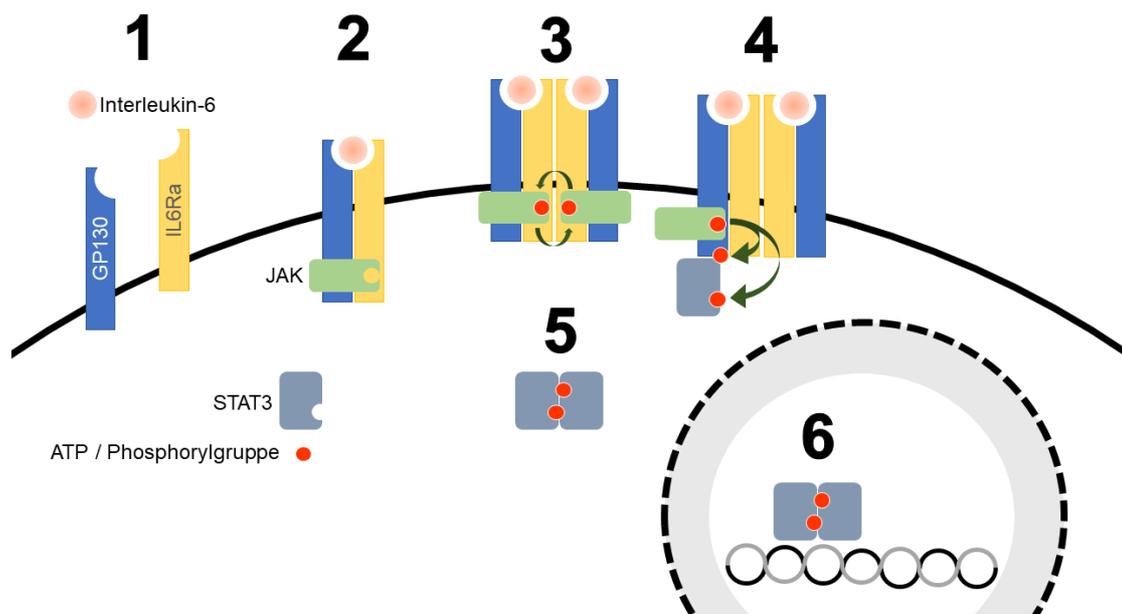


Abbildung 3: Die Aktivierung von STAT3 über den Gp130/IL6R-Komplex

Dargestellt ist der sogenannte kanonische Weg der Aktivierung von Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 3 vom Interleukin (IL)-6-Signal über den Komplex aus Glykoprotein (Gp)130 und den IL-6-Rezeptor (IL6R) und Januskinasen (JAK) bis hin zur nukleären Translokation.

- (1) Das IL-6-Signal erreicht die Plasmamembran.
- (2) Gp130 und der IL6R binden ihren Liganden.
- (3) Zwei Gp130-IL6R-IL6-Komplexe dimerisieren. Dadurch kommt es zur räumlichen Annäherung der assoziierten JAKs und diese transphosphorylieren sich gegenseitig.
- (4) Die aktivierten JAKs phosphorylieren wiederum zytoplasmatische Tyrosinseitenketten des Rezeptorkomplexes. STAT3 bindet mit der SH2-Domäne an das Phosphotyrosin. JAKs phosphorylieren die STATs an deren Tyrosinseitenketten
- (5) Zwei phosphorylierte STAT3-Moleküle dimerisieren durch reziproke Interaktion der Phosphotyrosine und der SH2-Domänen.
- (6) Phospho-STAT3-Dimere translokieren in den Zellkern. Dort wird die Transkription verschiedener Gene beeinflusst.

1.2.3.4. *Oncostatin M*

Oncostatin M (OSM) ist ebenfalls ein Mitglied der IL-6-Zytokinfamilie. In der Haut wird es durch T-Lymphozyten, Monozyten und dendritische Zellen freigesetzt. In menschlichen Keratinozyten bindet OSM an den Typ II-OSM-Rezeptor, einem Dimer aus OSMR- β und Gp130. Eine Bindung an ein Dimer aus dem LIF- β -Rezeptor und Gp130 wurde ebenfalls beschrieben [137]. Über STAT3 und den MAP-Kinase-Signalweg induziert OSM in Keratinozyten eine vermehrte Expression von proinflammatorischen Proteinen wie z.B. S100A7, von Proteinen der Chemotaxis wie z.B. CXCL-5 und IL-8 und von VEGF, einem

starken Induktor der Neovaskularisierung. Weiterhin führt OSM zu einer epidermalen Hyperplasie, wie sie in psoriatischen Läsionen beobachtet wird [138]. OSM induziert ebenfalls über STAT3 die Expression von S100A9, welches mit der Entstehung der Psoriasis in Verbindung gebracht wird [139].

1.2.4. Translokation von STATs in den Zellkern

Aktivierte STATs dissoziieren von ihrem Rezeptor. Durch reziproke Interaktion zwischen der SH₂-Domäne eines Monomers und der tyrosinphosphorylierten transkriptionsaktivierenden Domäne des anderen Monomers entstehen Dimere [140, 141]. Während für STAT4, STAT5A und STAT5B ausschließlich Homodimere beschrieben sind, wurden Heterodimere mit STAT1/STAT2 und STAT1/STAT3 beobachtet [142, 143]. Die STAT-Dimere werden über einen Importin-abhängigen Mechanismus in den Zellkern transportiert [144, 145].

1.2.5. Folgen der Aktivierung der STATs

Im Zellkern binden die STAT-Dimere an Mitglieder der Familie der GAS-Enhancer und es entstehen STAT-DNA-Komplexe [146]. Infolge dieser Komplexbildung kommt es zu einem veränderten Genexpressionsmustern.

Zellwachstum und -migration als Reaktion auf Hautverletzungen sowie das reguläre Haarwachstum zeigten sich abhängig von einer Genregulation durch STAT3 [104, 122, 147]. An Wundrändern verletzter Haut von Menschen und Mäusen hat STAT3 eine erhöhte Aktivität. Bei Mäusen mit inhibiertem STAT3 war die Wundheilung inhibiert [104]. Eine zusätzliche Aktivierung von STAT3 führte zu einer beschleunigten Wundheilung [148]. Zu den bisher identifizierten Zielgenen von STAT3 zählen CCND1, MYC, BCL-CL und MCL-1 [149]. STAT3-Zielgene beeinflussen die Reproduktion und die Embryonalentwicklung [103]. Eine Unterdrückung von STAT3 führt zum Tod des Embryos *in utero* [150].

Neben den physiologischen Funktionen wurde die Genregulation durch STAT3 auch mit der Entstehung maligner Neoplasien und anderen inflammatorischen Erkrankungen in Verbindung gebracht [151-153]. Es wurden zudem extranukleäre Effekte der STATs

beobachtet, zum Beispiel eine Beeinflussung des Mikrotubulinnetzwerks [154] und der Atmungskette [155].

1.2.6. STAT3 und Psoriasis

STAT3 wurde erstmals 1992 in der Akute-Phase-Reaktion als Antwort auf IL-6 entdeckt und damals zunächst „acute-phase response factor“ (APRF) genannt [156, 157]. Erst später wurde es der Familie der STATs zugeordnet. In der Pathogenese der Psoriasis spielt STAT3 eine wichtige Rolle. In psoriatischen Hautläsionen weisen sämtliche Keratinozyten eine erhöhte Aktivierung von STAT3 auf [60, 158]. Mehrere Genexpressionsanalysen zeigten eine Assoziation zwischen STAT3 und betroffener psoriatischer Haut [159, 160]. In transgenen Mäusen mit einer kontinuierlich aktiven Form von STAT3 wurde eine epidermale Hyperplasie, ein erhöhtes proliferatives Potential und eine verzögerte Seneszenz der Keratinozyten beobachtet [161]. Weitere Mausmodelle, in denen STAT3 auf unterschiedliche Weise aktiviert wurde, zeigten ebenfalls einen der Psoriasis ähnlichen Hautphänotyp [60, 162]. Mehrere Publikationen haben ein Modell der dysfunktionalen Wundheilung als Ursache der Psoriasis vorgeschlagen, in dem STAT3 eine Schlüsselrolle spielt [163, 164].

1.3. Antitumorlipide

Der Plättchen-aktivierende Faktor (1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholin, PAF) ist ein Glycerophospholipid, das im Organismus verschiedene Funktionen ausübt. Er induziert die Aggregation von Blutplättchen und beeinflusst inflammatorische Stimuli [165, 166]. Zur Signalweiterleitung bindet PAF an Rezeptoren in der Plasmamembran der Zielzelle [167].

Die Gruppe der Antitumorlipide (ATLs) besteht aus Alkylphospholipiden (APLs) und Alkylphosphocholinen (oft APCs abgekürzt). APLs sind synthetische Derivate des PAF. Sie haben eine Glycerol-Grundstruktur und eine Phosphocholin-Kopfgruppe. Sie unterscheiden sich in der Substitution an der sn-2-Position des Glycerols und in der Länge der aliphatischen Seitenkette (Abbildung 4). Das Ziel der erstmaligen Synthese von APLs war es, potente und gleichzeitig amphiphile Signalmoleküle zu erhalten. Im Gegensatz dazu besitzen APCs keine Glycerol-Grundstruktur. Der apolare Rest ist hier direkt mit der Phosphocholin-Kopfgruppe verbunden.

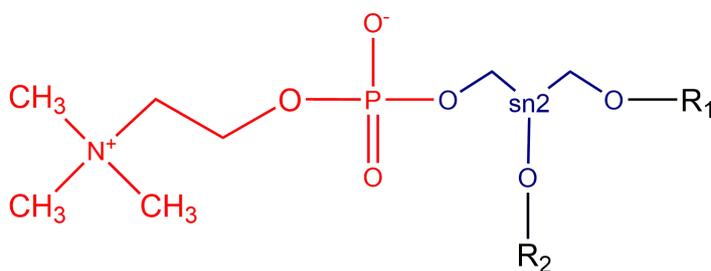


Abbildung 4: Die Grundstruktur der Alkylphospholipide (APLs).

APLs bestehen aus einer Grundstruktur aus Glycerol (blau), die mit einer Phosphocholin-Kopfgruppe (rot) verbunden ist. Außerdem sind zwei weitere Reste an das Glycerol gebunden, eine apolare Fettsäure (R1, schwarz) und ein weiterer Rest wie zum Beispiel Inositol, Glukose oder eine Methoxygruppe (R2, schwarz). Das Kohlenstoffatom des Glycerols in sn2-Position ist gekennzeichnet (sn2).

Edelfosine (1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine, ET-18-OCH₃) ist ein ATL der ersten Generation. Es ist ein synthetisches Analog des PAF mit einer apolaren Methoxygruppe (-OCH₃) in der sn-2-Position des Glycerols. Edelfosine kann das Wachstum und die Invasivität von Tumorzellen reduzieren sowie diese zur Apoptose bringen, ohne dabei auf gesunde Zellen zu wirken [168, 169]. Gleichzeitig verbessert es die Fähigkeiten von Makrophagen, gegen Tumorzellen vorzugehen [170]. Es wird in der Therapie von Leukämien und von soliden Tumoren, wie zum Beispiel bei Gliomen oder Mammakarzinomen, erprobt [171-174].

Miltefosine (Hexadecylphosphocholine, HePC) ist ein ATL, das ursprünglich zur Therapie maligner Neoplasien entwickelt wurde [175]. Mittlerweile wird es erfolgreich in der Behandlung der Leishmaniose eingesetzt [176]. Auch in der Palliativtherapie bei Hautmetastasen von Mamakarzinomen zeigte es Erfolge [177].

Ein weiteres ATL ist Glc-PAF (1-O-octadecyl-2-O- α -D-glucopyranosyl-sn-2-glycero-3-phosphatidylcholine), welches durch eine Substitution von D-Glukose an der sn-2-Position aus PAF entsteht. Es wurde beobachtet, dass Glc-PAF in Keratinozyten die Proliferation inhibiert und zur Apoptose führt [178].

1.3.1. Wirkmechanismen der Antitumorlipide

Für die bereits existierenden ATLs wurden verschiedene Wirkmechanismen vorgeschlagen, darunter die folgenden:

1.3.1.1. *Beeinflussung des Phospholipidmetabolismus*

Bereits 1978 wurde für die Wirksamkeit verschiedener ATLs unter anderem eine mögliche Beeinflussung des Phospholipidmetabolismus vermutet [179]. Eine der Theorien, die weiter verfolgt wurden, basiert darauf, dass ATLs als Antimetabolite in der 3-sn-Phosphatidylcholinsynthese wirken [180]. In diesem Modell kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von zytotoxischen Lysophospholipiden insbesondere in Tumorzellen. Eine 2001 publizierte Arbeit ging ebenfalls davon aus, dass eine Beeinflussung des Phospholipidmetabolismus die Wirksamkeit von ET-18-OCH₃ begründet. Dabei wurde die beobachtete Apoptose in Tumorzellen auf Veränderungen der mitochondrialen Lysophospholipid-Zusammensetzung zurückgeführt [181].

1.3.1.2. *Beeinflussung der Membraneigenschaften*

ATLs konnten durch die Eingliederung in biologische Membranen deren physikalische Eigenschaften beeinflussen, zum Beispiel deren Fluidität [182]. So wurde für Edelfosine

nachgewiesen, dass es in einer leukämischen Zelllinie auf die Organisation von Lipid Rafts der Zellmembran und den assoziierten Fas-Rezeptor einwirken kann [183].

1.3.1.3. *Beeinflussung der Elektrolytbalance*

Für SRI 62-834, ein mit ET-18-OCH₃ verwandtes ATL, konnte eine Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration nachgewiesen werden und es wurde vermutet, dass auf diesem Weg eine zytotoxische Wirkung erreicht wird [184].

1.3.1.4. *Beeinflussung des Nährstofftransports*

Für ein ATL (1-Alkyl-2-Methoxy-Glycero-3-Phosphocholin) konnte nachgewiesen werden, dass es den Transport verschiedener Nährstoffe, wie zum Beispiel Cholin, Fettsäuren oder D-Glukose, beeinflussen kann. Dadurch kann ein Nährstoffmangel hervorgerufen werden, der selektiv Tumorzellen beeinträchtigen könnte [185].

1.3.1.5. *Beeinflussung intrazellulärer Signalwege*

Durch verschiedene ATLs konnten in verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedliche Effekte auf eine Vielzahl von Zellfunktionen beobachtet werden. Um diese Variabilität zu erklären, wurde die Wirkung der ATLs auf intrazelluläre Signalwege untersucht. In verschiedenen leukämischen Zelllinien ist die Aktivität der phospholipid-sensitiven Ca²⁺-abhängigen Proteinkinasen erhöht. Es wurde gezeigt, dass ein ATL (1-Octadecyl-2-Methyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin) die Aktivität dieser Kinasen inhibieren kann [186]. Ebenfalls in leukämischen Zelllinien wurde eine Inhibition des MAPK/SAPK-Signalwegs durch drei verschiedene ATLs beobachtet [187]. In Zelllinien aus einem epidermoiden Karzinom (A431) und aus einem Zervixkarzinom (HeLa) konnte mit drei verschiedenen ATLs die Aktivität des PI3K-Akt-Signalwegs reduziert werden [188]. Auch in menschlichen Brustepithelzellen (MCF10A-ras) konnte durch ein ATL der Akt-Signalweg und ERK1/2 inhibiert werden [189].

1.3.2. Inositol-C2-PAF

Die erfolgreiche Synthese von Inositol-C2-PAF wurde erstmals im Jahr 2006 beschrieben [190]. Inositol-C2-PAF (1-O-Octadecyl-2-O-(2-(myo-Inositol)-Ethyl)-sn-Glycero-3-(r/s)-Phosphatidylcholin, siehe Abbildung 5) besitzt ein myo-Inositol an der sn-2-Position. Zwischen dem zyklischen Polyalkohol und dem Glycerol-Rückgrat befindet sich eine C2-Gruppe.

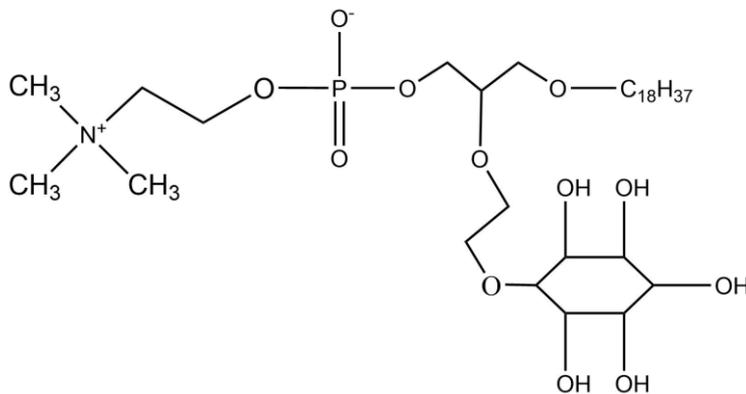


Abbildung 5: Die Struktur von Inositol-C2-PAF.

Bei diesem Alkylphospholipid ist das Glycerol neben der Phosphocholin-Kopfgruppe noch mit einer apolaren $C_{18}H_{37}$ -Gruppe sowie über eine C2-Gruppe mit myo-Inositol verbunden.

Nach der Inkubation von HaCaT-Zellen mit Inositol-C2-PAF kann ein breites Wirkungsspektrum beobachtet werden. Die maximale Wirkstoffkonzentration von Inositol-C2-PAF ist begrenzt. Es wurde gezeigt, dass Inositol-C2-PAF für HaCaT-Zellen bei einer Inkubation über 48 Stunden bis zu einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ nicht toxisch wirkt [190]. Es inhibiert in subtoxischen Konzentrationen die Proliferation und induziert die Differenzierung von Keratinozyten [190]. Der beobachtete antiproliferative Effekt wurde dabei nicht durch Apoptose hervorgerufen. Die Wirkkonzentration war dabei geringer als die des verwandten Glc-PAF. Außerdem war Inositol-C2-PAF innerhalb der Zellen stabiler als Glc-PAF [190, 191].

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit mit PAF üben weder Inositol-C2-PAF noch andere APLs ihre Effekte über den PAF-Rezeptor aus [169, 191]. 2011 bewies die Arbeitsgruppe

um van Haefen, dass Inositol-C2-PAF in Jurkat- und Burkitt-like Lymphoma Line (BJAB)-Zellen in nicht-toxischen Konzentrationen zur Apoptose führt. Dadurch zeigte sich für das Lipid erstmalig eine potentielle Anwendungsmöglichkeit in der Tumorthherapie [192]. Im gleichen Jahr zeigten Semini et al., dass Inositol-C2-PAF bei HaCaT- und Plattenepithelkarzinom-Zellen die Anheftung an die Extrazellulärmatrix verstärkt und die Motilität der Zellen reduziert [193]. Die Inhibition der Motilität wurde durch eine Interferenz mit der Umverteilung von F-Aktin und eine Inhibition des FAK/Src-Signalwegs, der die Zellmigration reguliert, verursacht. Da die Migration ein für die Tumormetastasierung essentieller Prozess ist, konnte Inositol-C2-PAF durch diese Ergebnisse erneut sein Potential als Antitumorlipid bestätigen.

Während sich ein Teil der Forschung an Inositol-C2-PAF auf die mögliche Anwendung in der Tumorthherapie konzentrierte, verdichteten sich zunehmend Hinweise darauf, dass das APL potente immunmodulatorische und antiinflammatorische Eigenschaften haben könnte. Eine Analyse des Genexpressionsprofils in HaCaT-Keratinocyten bestätigte, dass zahlreiche Gene mit immunmodulatorischem Potential durch das APL reguliert werden [194]. Semini et al. zeigten 2014, dass Inositol-C2-PAF in einem *in vitro*-Modell für epidermale Inflammation sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene wichtige Kennzeichen der Entzündung in Keratinocyten reduzieren kann [64]. In *in vivo*- und *in vivo*-Modellen konnte zudem gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF auch in Endothelzellen ein entzündungshemmendes Potential besitzt [3].

1.4. Ziele dieser Arbeit

Psoriasis ist eine der häufigsten Hauterkrankungen in Deutschland. Sie geht neben einem hohen Leidensdruck der Betroffenen mit hohen Kosten für die Gemeinschaft einher. Eine Heilung ist nicht möglich. Obwohl zahlreiche Therapiemöglichkeiten existieren, tritt noch immer in zahlreichen Fällen kein zufriedenstellender Behandlungserfolg ein. Zur Pathogenese der Psoriasis existieren verschiedene Modelle. In der vorliegenden Arbeit wird ein Modell vorgestellt, das die bisherigen Forschungsergebnisse verbindet, wobei die positiv-selbstverstärkenden Signalkaskaden des IL-6 im Mittelpunkt stehen. IL-6 aktiviert den STAT3-Signalweg in Keratinozyten. STAT3 wiederum reguliert die proinflammatorische Reaktion und es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität des STAT3-Signalwegs mit der Entstehung eines psoriatischen Phänotyps assoziiert ist.

Inositol-C2-PAF ist ein APL, das anti-proliferative und differenzierungs-fördernde Eigenschaften besitzt, die zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen - wie zum Beispiel der Psoriasis - eingesetzt werden könnten.

Um das Potential von Inositol-C2-PAF für die Therapie dieser Erkrankungen weiter zu erforschen, ist es zunächst notwendig, den Einfluss des APL auf proinflammatorische Signalwege zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Einflüsse von Inositol-C2-PAF auf den STAT3-Signalweg in Keratinozyten untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Materialien in der Zellkultur

Die in der Zellkultur verwendeten Materialien werden in den Tabellen 3 - 6 dargestellt.

Tabelle 3: Zelllinie

Name	Herkunft
HaCaT-Zelllinie	Die Zelllinie kann z.B. von ATCC erworben werden (LGC Standards GmbH, 46485 Wesel, http://www.lgcstandards-atcc.org) Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Exemplare waren ein freundliches Geschenk von Professor Dr. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg)

Tabelle 4: Nährmedien und Zusätze

Name	Hersteller
RPMI	Lonza, Basel, Schweiz
Fötales Kälberserum (Fötal Bovine Serum, FBS)	HyClone Thermo Fisher Scientific, Bonn
Penicillin	PAA Laboratories Gesellschaft M.B.H., Österreich (mittlerweile General Electric Company, USA)
Streptomycin	PAA Laboratories Gesellschaft M.B.H., Österreich (mittlerweile General Electric Company, USA)
L-Glutamin	PAA Laboratories Gesellschaft M.B.H., Österreich (mittlerweile General Electric Company, USA)
Defined Keratinocyte Serum-Free-Medium inkl. Growth Supplement	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, ehemals Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 5: Arbeitsmaterialien in der Zellkultur und zur Zellernte

Name	Bestandteile
Phosphate-buffered saline (PBS)	150 mM NaCl, 3 mM KCl, FBS 10%, 8 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 1 mM KH ₂ PO ₄ in Aqua bidest. bei pH 7,2
PBS-EDTA	0,05% EDTA in PBS
Solubilisierungspuffer	150 mM NaCl, 50 mM Hepes / NaOH bei pH 7,5, 1 mM CaCl ₂ , 1% Triton X-100 in destilliertem H ₂ O
Reduzierungspuffer	250 mM Tris, 25% (Volumenprozent, v/v) Glycerol, 7,5% (w/v) SDS, 0,25 mg/ml Bromophenolblau und 12,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Trypsin	PAA Laboratories Gesellschaft M.B.H., Österreich (mittlerweile General Electric Company, USA)
Wachstumsmedium	450 ml RPMI, 50 ml fötales Kälberserum, 50 MU Penicillin, 50 mg Streptomycin, 220 mg L-Glutamin

Tabelle 6: Zytokine

Name	Hersteller
Recombinant Human Interleukin-1 alpha	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Recombinant Human Interleukin 6	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Recombinant Human Epidermal Growth Factor	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Recombinant Human Oncostatin M	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Recombinant Human Tumor Necrosis Factor-alpha	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Recombinant Human Interleukin-1 beta	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Recombinant Human Interferon Gamma	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Recombinant Human Interleukin-17A	ImmunoTools GmbH, Friesoythe
Recombinant Human Interleukin-22	ImmunoTools GmbH, Friesoythe

2.1.2. Kryokonservierung und Inkulturnahme von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden sie in 10% DMSO und 90% fötalem Kälberserum gelöst. Die Temperatur wurde langsam abgesenkt. Die Zellen wurden bei -80°C, bzw. zur längeren Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Inkulturnahme wurden die gefrorenen Proben rasch mit vorgewärmtem RPMI-Medium auf Raumtemperatur erwärmt. Durch wiederholtes Zentrifugieren und erneutes Lösen des Zellpellets in RPMI-Medium wurde das verbliebene DMSO ausgewaschen.

2.1.3. Standardisiertes Zellkulturprotokoll

Um die Effekte von Inositol-C2-PAF auf die Haut zu simulieren, wurden immortalisierte menschliche Keratinozyten in Form der HaCaT-Zelllinie verwendet.

HaCaT-Zellen wurden bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂ in RPMI-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 440 mg/l Glutamin, 100 U/l Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin in Zellkulturflaschen kultiviert. Zellen wurden mit Trypsin und 0,02 mM EDTA gelöst. Um für jeden Versuch eine konstante Anzahl an Zellen pro Kulturschale auszusäen, wurden die in RPMI-Medium gelösten Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Für die Experimente wurden Zellen mit einer Konzentration von 8×10^5 Zellen pro 6cm-Zellkulturschale ausgesät. Sie wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, RPMI mit FBS) kultiviert, bis sie subkonfluent waren, was zumeist nach ca. 16 Stunden erreicht war. Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mit Defined Keratinocyte Serum-Free-Medium mit Growth Supplement inkubiert. Nach 6 Stunden wurden die Keratinozyten einmal mit PBS gewaschen und mit Defined Keratinocyte Serum-Free-Medium ohne Growth Supplement für 16 Stunden kultiviert. Diese Prozedur wird im Folgenden auch das standardisierte Zellkulturprotokoll genannt.

2.1.4. Behandlung mit Zytokinen und Inositol-C2-PAF

Inositol-C2-PAF wurde wie von Fischer et al. beschrieben synthetisiert [190]. Im Anschluss an das standardisierte Zellkulturprotokoll wurden die Zellen entweder mit oder ohne Zytokine in einer Konzentration von 10 ng/ml und mit oder ohne Inositol-C2-PAF in einer Konzentration von 5µM in Defined Keratinocyte Serum-Free Medium ohne Growth Supplement kultiviert.

2.2. Biochemische Methoden

2.2.1. Western Blot

2.2.1.1. Materialien in der Western Blot-Technik

Die in der Western Blot-Technik verwendeten Materialien sind in den Tabellen 7 – 11 dargestellt.

Tabelle 7: Geräte in der Western Blot-Technik

Funktion	Gerät	Hersteller
Digitales Imaging-System	Versadoc 4000 MP	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
SDS-PAGE	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Zentrifuge (gekühlt)	Thermo Scientific Heraeus Biofuge Fresco	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Tabelle 8: Lösungen zum Gießen von Blot-Gelen

Name	Bestandteile
Lösung A (Solution A)	30% (w/v) Acrylamide, 0,8% N,N-Methylenbisacrylamid in destilliertem Wasser
Lösung B (Solution B)	0,4% (w/v) SDS, 1,5 M Tris at pH 8,8 in destilliertem Wasser
Lösung C (Solution C)	0,4% (w/v) SDS, 0,5 M Tris at pH 6,8 in destilliertem Wasser

Tabelle 9: Puffer-, Spül-, Blockier- und Färbelösungen in der Western Blot-Technik

Name	Bestandteile
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	192 mM Tris bei pH 7,3, 25 mM Glycin, 0,1% (Gewichtsprozent, w/v) SDS in destilliertem Wasser
Blottingpuffer(10x)	1 M Tris bei pH 8,3, 1.92 M Glycin, 10% (v/v) Ethanol in destilliertem Wasser
Phosphate-buffered saline (PBS)	150 mM NaCl, 3mM KCl, fötal bovine serum (FBS) (10%), 8 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 1 mM KH ₂ PO ₄ in Aqua bidest. bei pH 7,2
Tris-buffered saline (TBS)	10 mM Tris bei pH 7,6, 150 mM NaCl in Aqua bidest
TBS with Tween-20 (TBS-T)	0,1% (v/v) Tween-20 in TBS
Blockierlösung	5% (w/v) BSA in TBS-T
Ponceau S-Färbelösung(5x)	2% (w/v) Ponceau S, 30% (v/v), Trichloroacetsäure, 30% (v/v) Sulfosalicylsäure in destilliertem Wasser

Tabelle 10: Antikörper

Name	Herkunftsspezies	Methode	Hersteller
Akt	Kaninchen	Western Blot	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt a.M.
Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse	Ziege	Immunfluoreszenz	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit	Ziege	Immunfluoreszenz	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Alexa Fluor 594 Goat anti-Mouse	Ziege	Immunfluoreszenz	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit	Ziege	Immunfluoreszenz	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
α -Tubulin	Maus	Western Blot	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
β -Aktin	Maus	Western Blot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
ERK (pT202/pY204)	Kaninchen	Western Blot	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt a.M.

Name	Herkunftsspezies	Methode	Hersteller
Goat anti-Mouse-POD	Ziege	Western Blot	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich
Goat anti-Rabbit-POD	Ziege	Western Blot	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich
Jak2	Kaninchen	Western Blot	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt a.M.
Phospho-Akt (Ser573)	Maus	Western Blot	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt a.M.
Phospho-ERK1/2	Maus	Western Blot	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, ehemals BioSource
Phospho-Jak2	Kaninchen	Western Blot	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt a.M.
Phospho-STAT3 (Tyr705)	Kaninchen	Western Blot, Immunfluoreszenz	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt a.M.
STAT3	Maus	Western Blot, Immunfluoreszenz	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt a.M.

Tabelle 11: Proteinmarker und Chemilumineszenzlösungen in der Western Blot-Technik

Name	Hersteller
Precision Plus Protein™ Standards Dual Color	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Super Signal West Femto Chemiluminescent Substrate	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

2.2.1.2. Proteinquantifizierung

Die Gesamtproteinkonzentration der Proben wurde mittels BCA-Proteinassay quantifiziert. Ein BSA-Proteinstandard (Pierce, USA) mit einer Konzentration von 1 µg/µl wurde verwendet, um mit destilliertem Wasser eine Verdünnungsreihe zu erstellen. Die Proben wurden 1 zu 10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Stammlösungen A (10 g/l Natriumbicinchoninat, 20 g/l Natriumcarbonat, 1,6 g/l Natriumtartrat, 4 g/l Natriumhydroxid und 9,5 g/l Natriumhydrogencarbonat bei pH 11,25) und B (40 g/l Kupfersulfat-Pentahydrat) wurden im Verhältnis 1:50 zusammengemischt und jeweils 180 µl davon wurden zu Standard und Proben gegeben. Nach einer Inkubation über 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 570 nm in einem ELISA-Plattenlesegerät bestimmt. Mithilfe von Microsoft Excel 2016 wurde mit den Werten der Verdünnungsreihe eine Standardkurve bestimmt und anhand dieser der Gesamtproteingehalt der Proben berechnet.

2.2.1.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Im Anschluss an das standardisierte Zellkulturprotokoll und die Behandlung mit Zytokinen und/oder Inositol-C2-PAF wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Solubilisierungspuffer geerntet, über 30 Minuten auf Eis lysiert und anschließend für 15 Minuten mit 13 000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert. 30 µg denaturiertes Protein jeder Probe wurde auf ein 10 %-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Laufkontrolle und Überprüfung des Molekulargewichts wurde für jeden Lauf der Bandenmarker Precision Plus Protein™ Standards Dual Color mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 80 - 160 V.

2.2.1.4. Western Blot

Nach erfolgter SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine unter dem Blottingpuffer für 1 Stunde bei 4°C und einer konstanten Stromstärke von 250 mA auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der

Proteintransfer auf die Membranen wurde mittels Färbung durch Ponceau S-Lösung überprüft. Die Farbe wurde danach mit 0,1% Essigsäure und TBS ausgewaschen. Die Membranen wurden für eine Stunde in der Blockierlösung blockiert und dann über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Blots dreimal mit TBS-T gewaschen und dann mit dem entsprechenden peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membranen wurden mit Chemilumineszenzreagenzien behandelt und mittels eines digitalen Imaging-Systems sichtbar gemacht.

2.2.2. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

2.2.2.1. Materialien in der qRT-PCR-Technik

Die in der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) verwendeten Materialien werden in den Tabellen 12 – 14 dargestellt.

Tabelle 12: Geräte in der qRT-PCR-Technik

Funktion	Gerät	Hersteller
qPCR	iCycler inklusive MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Zentrifuge (gekühlt)	Thermo Scientific Heraeus Biofuge Fresco	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Tabelle 13: Ausrüstung zur RNA-Gewinnung, cDNA-Synthese und qRT-PCR

Name	Hersteller
Quick-RNA MicroPrep-Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg
GoScript Reverse Transcription-Kit	Promega, Madison, USA
GoTaq 2-Step-qRT-PCR System-Kit	Promega, Madison, USA

Tabelle 14: Verwendete Primer

Name	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'
BIRC5/Survivin	TCCGGTTGCGCTTTCCT	TCTTCTTATTGTTGGTTTCCTTGC
CCND1	TATTGCGCTGCTACCGTTGA	CCAATAGCAGCAAACAATGTGAAA
GAPDH	CATCACCATCTTCCAGGAGC	CACCACCCTGTTGCTGTAGC
IL-6	GGCACTGGCAGAAAACAACC	GCAAGTCTCCTCATTGAATCC
S100A7	TGCTGACGATGATGAAGGAG	ATGTCTCCAGCAAGGACAG
STAT3	AGCCGCTTCCTGCAAGAGTC	TCTAGGCAGATGTTGGGCGG

2.2.2.2. RNA-Vorbereitung

Nach der entsprechenden Stimulation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Zur Gewinnung von RNA wurde das Quick-RNA MiniPrep-Kit entsprechend der Herstelleranleitung verwendet. Die Zellen wurden mit RNA-Lyse-Puffer geerntet. Mittels der Zymo-Spin-IC-Säule wurde die RNA isoliert und in drei Waschschrritten mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern aufgereinigt. Die RNA wurde schließlich in DNase- und RNase-freiem destillierten Wasser gelöst.

2.2.2.3. cDNA-Synthese

Zur Synthese der komplementären DNA (complementary DNA, cDNA) wurde das GoScript Reverse Transcription-Kit entsprechend der Herstelleranleitung verwendet. Dabei wurden zunächst die zu untersuchende RNA, Oligo-dT-Primer und nukleasefreies Wasser gemischt, auf 70°C erhitzt, in Eiswasser abgekühlt und zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Reverse-Transkriptions-Mix hinzugefügt, bestehend aus Reaktionspuffer, MgCl₂, Nukleotidmix, Ribonucleaseinhibitor, nukleasefreiem Wasser und Reverser Transkriptase. Es folgten das Annealing bei 25°C, das Extending bei 42°C und die Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70°C. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.4. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde mittels des GoTaq 2-Step-qRT-PCR System-Kit entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Primer wurden mittels Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) erstellt. Die zu untersuchende cDNA wurde mit GoTaq qPCR Master Mix, nukleasefreiem Wasser und Forward- und Reverse-Primer gemischt. Die qRT-PCR wurde in einem MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection-System durchgeführt. Es erfolgten ein Zyklus zur DNA-Polymerase-Aktivierung bei 95°C und anschließend 35 Zyklen zur Anlagerung, Erweiterung und Denaturierung bei 60°C, 72°C und 95°C.

Der Cycle Threshold (Ct, Schwellenwertzyklus) ist der Replikationszyklus, an dem die Amplifikationskurve einen Schwellenwert überschreitet. Der Ct ist bei einer angenommenen konstanten Verdopplungsrate des untersuchten cDNA-Abschnitts proportional zur initialen Konzentration.

2.2.3. Immunfluoreszenz

Zur Immunfluoreszenzanalyse wurden HaCaT-Zellen in einer 8-Kammer-Platte in einer Konzentration von 50 000 Zellen pro Kammer ausgesät. Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, RPMI-Medium mit FBS) für 16 Stunden kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Defined Keratinocyte Serum-Free-Medium mit Growth Supplement für 6 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS und mit Defined Keratinocyte Serum-Free-Medium ohne Growth Supplement für 16 Stunden kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen für eine Stunde mit Medium ohne Wachstumssupplement und mit oder ohne Inositol-C2-PAF (Konzentration: 5µM) inkubiert. Abschließend wurde das Medium gegen Medium ohne Wachstumssupplement und mit oder ohne den entsprechenden Zytokinen (Konzentration: 10 ng/ml) und mit oder ohne Inositol-C2-PAF (Konzentration: 5µM) ausgewechselt. Nach einer Inkubation über 15 Minuten wurden die Zellen zweimal mit PBS bei 4°C gewaschen. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 4% PFA fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden sie für 10 Minuten mit Methanol bei -20°C inkubiert. Daraufhin wurden sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 5% BSA in PBS

blockiert, dreimal mit TBS gewaschen und über Nacht mit dem entsprechenden Primärantikörper in 5% BSA in TBS-T inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen fünfmal mit TBS-T gewaschen und für 2 Stunden mit dem entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper in TBS-T inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit TBS-T. Danach wurde der gesamte Flüssigkeitsüberstand entfernt. Zwei Tropfen Fluoromount (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurden pro Kammer hinzugegeben und ein Deckglas wurde aufgelegt. Die Präparate wurden mit einem Axiovert 200-Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) und mit einer Axioacam und der Axiovision-Software (Version 4.9.1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) analysiert.

2.3. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

2.3.1. Auswertung der Western Blots

Die Quantifizierung durch densitometrische Analyse der Western Blots wurde mittels ImageLab (Version 6.0.1, BioRad, www.bio-rad.com) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden stichprobenartig mit ImageJ (<https://imagej.nih.gov>) überprüft und es zeigten sich vergleichbare Ergebnisse.

Die densitometrisch gemessenen Werte des zu untersuchenden Proteins wurden mit β -Aktin normalisiert. Wurden phosphorylierte Proteine untersucht, so wurde zusätzlich auf die nicht-phosphorylierte Form normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse aller Konditionen auf das Niveau der Kontrolle normalisiert.

Die Ergebnisse wurden mittels SPSS Statistics 25 (IBM) analysiert. Zunächst wurde die Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Lag keine Normalverteilung vor, so wurde mittels des Levene-Tests auf Varianzgleichheit überprüft.

Da durch das oben genannte Verfahren die Kontrollen stets als 1 definiert sind, können statistische Auswertungen im Verhältnis zur Kontrolle nur als Einstichproben-t-Test mit dem Testwert 1 durchgeführt werden. Zur Vereinheitlichung wurden daher auch bei den restlichen statistischen Auswertungen der entsprechenden Versuche die Vergleichsgruppen jeweils auf die Bezugsgruppen normalisiert und ebenfalls der Einstichproben-t-Test angewendet.

2.3.2. Auswertung der qRT-PCRs

Ct-Werte wurden aus dem Programm iQ5 (BioRad, München) ausgelesen. Mittels Microsoft Excel 2016 wurden $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte entsprechend der Methode nach Livak und Schmittgen [195] gewonnen, wobei die Normalisierung auf das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) erfolgte.

Da der Ct-Wert aus der logarithmischen Skala des Fluoreszenzsignals entsteht, ist er, wie von Livak und Schmittgen beschrieben [195], ein logarithmischer Ausdruck und sollte zum Zweck der statistischen Auswertung in eine lineare Form überführt werden. Demzufolge wurden alle Ct-Werte vor der statistischen Auswertung linearisiert. Die Ergebnisse wurden mittels SPSS Statistics 25 (IBM) analysiert. Zunächst wurde die Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Lag keine Normalverteilung vor, so wurde mittels des Levene-Tests auf Varianzgleichheit überprüft. Die Ergebnisse wurden anschließend mittels des t-Tests für verbundene Stichproben überprüft.

2.3.3. Grafische Darstellung

Die Ergebnisse der Versuche wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 8 graphisch dargestellt.

Western Blots und qRT-PCRs wurden in einer für die biochemische Laborarbeit üblichen Anzahl wiederholt, zumeist drei- bis sechsmal. Die Mittelwerte der Ergebnisse wurden als Balkendiagramme dargestellt und die jeweils errechnete Signifikanz der Ergebnisse symbolisch dargestellt. Da bei gezeigten Versuchen mit drei Wiederholungen die Darstellung der Einzelwerte im Verlauf über die verschiedenen Bedingungen aussagekräftiger ist als die Darstellung einer Standardabweichung, wurde jene Darstellungsform sowohl für Versuche mit drei Wiederholungen und zudem zur Vereinheitlichung und Übersichtlichkeit auch für die Versuche mit mehr als drei Wiederholungen gewählt.

Für Auswertungen der Daten aus Publikationen von Semini et al. wurde deren Darstellungsweise in Form eines Balkendiagramms mit Mittelwert und Standardabweichung übernommen.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Abbildungen außerhalb des Ergebnisteils wurden erstellt mit Hilfe der folgenden Programme:

- (1) Microsoft PowerPoint 2016
- (2) ChemDraw Prime 16.0
- (3) Apple Keynote (inkl. iCloud Keynote) Versionen 4.0 – 11.0
- (4) GIMP 2.10.10

3. Ergebnisse

3.1. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf STAT3

3.1.1. Analyse der Proteinexpression

HaCaT-Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit wechselnden Kombinationen aus Inositol-C2-PAF und IL-6 inkubiert. Ein Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3 und β -Aktin wurde durchgeführt. Die optische Dichte wurde quantifiziert und die Werte für STAT3 auf β -Aktin normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurden die normalisierten Mittelwerte erneut auf die jeweilige Vergleichsgruppe bezogen und mittels des Einstichproben-t-Tests analysiert.

Inositol-C2-PAF reduzierte in HaCaT-Zellen sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubation die intrazelluläre Proteinmenge von STAT3 in An- und Abwesenheit von IL-6 signifikant. Ein signifikanter Effekt von IL-6 allein auf die Proteinexpression von STAT3 konnte nicht beobachtet werden.

Im Mittelwertvergleich von der Kontrolle zur Stimulation mit Inositol-C2-PAF zeigte sich sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden in jeweils sechs Versuchen eine signifikante Reduktion der Proteinexpression von STAT3 (24 Stunden: $p = 0,01$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,69; Abbildung 6B; 48 Stunden: $p = 0,02$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,64; Abbildung 6C).

Die statistische Analyse der Mittelwerte der Proteinexpression von STAT3 zeigte zu beiden Zeitpunkten bei Zellen, die allein mit IL-6 behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle in jeweils sechs Versuchen keine signifikanten Unterschiede (24 Stunden: $p = 0,4$; Mittelwertunterschied von 1 zu 1,1; Abbildung 6B; 48 Stunden: $p = 0,055$; Mittelwertunterschied von 1 zu 2,4; Abbildung 6C).

Wurde die Stimulation mit IL-6 allein mit der kombinierten Stimulation mit Inositol-C2-PAF und IL-6 verglichen, zeigte sich in jeweils sechs Versuchen nach 24 Stunden eine sehr und nach 48 Stunden eine hoch signifikante Reduktion der Proteinexpression von STAT3 (24 Stunden: $p = 0,008$; Mittelwertsunterschied von 1 zu 0,67; Abbildung 6B; 48 Stunden: $p < 0,001$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,3; Abbildung 6C).

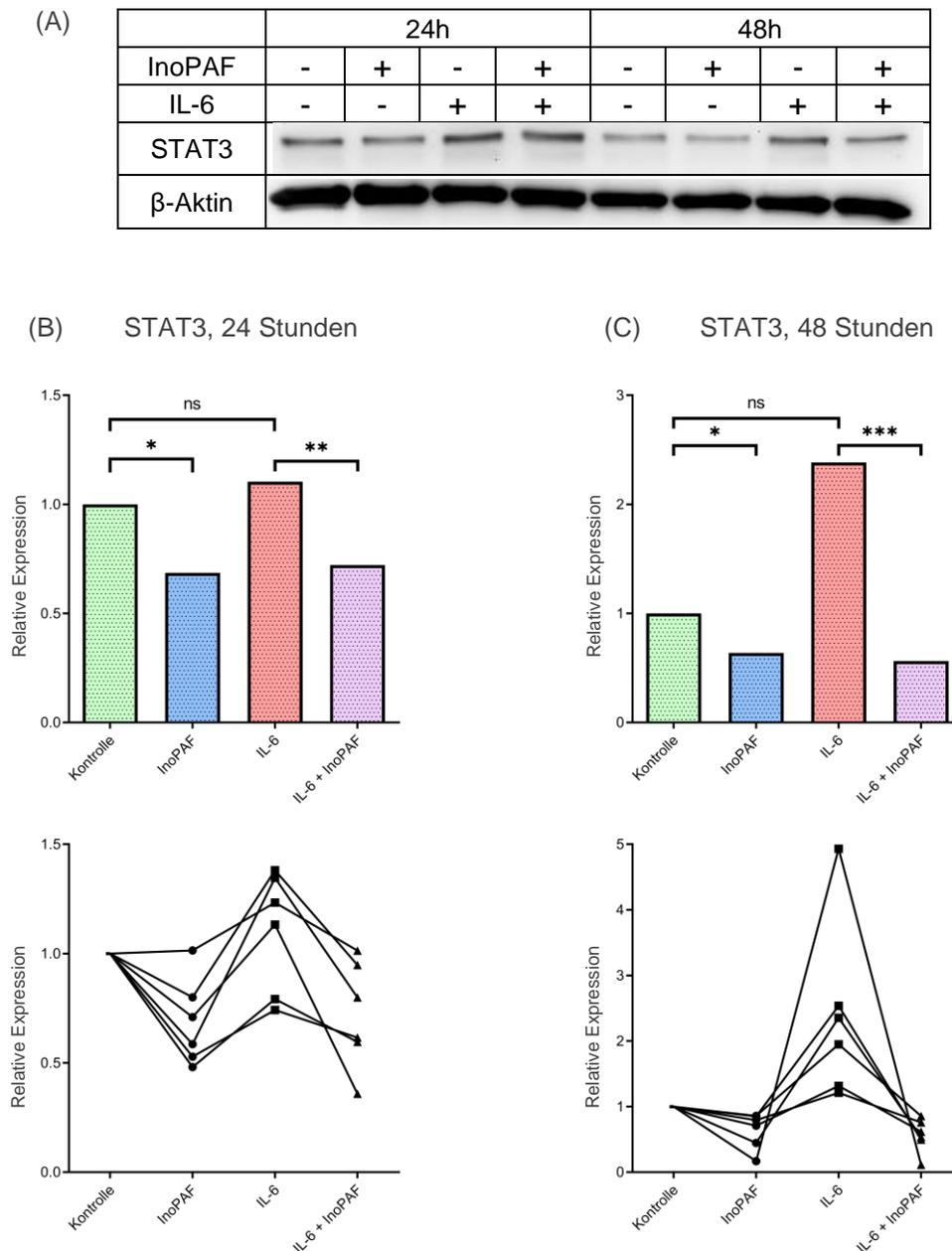


Abbildung 6: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf STAT3 auf Proteinebene.

HaCaT-Zellen wurden für 24 (B) und 48 (C) Stunden mit (+) oder ohne (-) Interleukin-6 (IL-6) und Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. Ein Immunoblot mit Antikörpern gegen STAT3 und β -Aktin wurde durchgeführt.

(A): Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 6$.

(B) und (C): Die optische Dichte der jeweiligen Signale wurde quantifiziert und die Werte für STAT3 auf β -Aktin normalisiert. Oberhalb: Abgebildet sind die Mittelwerte aus sechs Versuchen, normalisiert auf die Vergleichsgruppe. Zur statistischen Auswertung wurde jeweils auf die Vergleichsgruppe normalisiert und die Mittelwerte mit Hilfe des Einstichproben-t-Tests analysiert. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Unterhalb: Abgebildet sind die einzelnen Ergebnisse normalisiert auf die Kontrolle. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

3.1.2. Analyse der mRNA-Expression

Um einen möglichen Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Transkription von STAT3 zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen für 24 und 48 Stunden mit oder ohne Inositol-C2-PAF inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für STAT3 durchgeführt. Parallel wurde die qRT-PCR mit Primern für GAPDH durchgeführt, auf das normalisiert wurde. Anschließend wurden die Mittelwerte verglichen. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten Ct-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichprobe analysiert.

Inositol-C2-PAF reduzierte im Vergleich zur Kontrolle sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden die cDNA-Konzentration von STAT3 signifikant (24 Stunden: insgesamt drei Versuche; t-Test bei einer Stichprobe; $p = 0,03$; Mittelwertunterschied ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) von 1 zu 0,64.; Abbildung 8A; 48 Stunden: insgesamt sechs Versuche; t-Test bei einer Stichprobe; $p = 0,005$; Mittelwertunterschied ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) von 1 zu 0,61; Abbildung 8B).

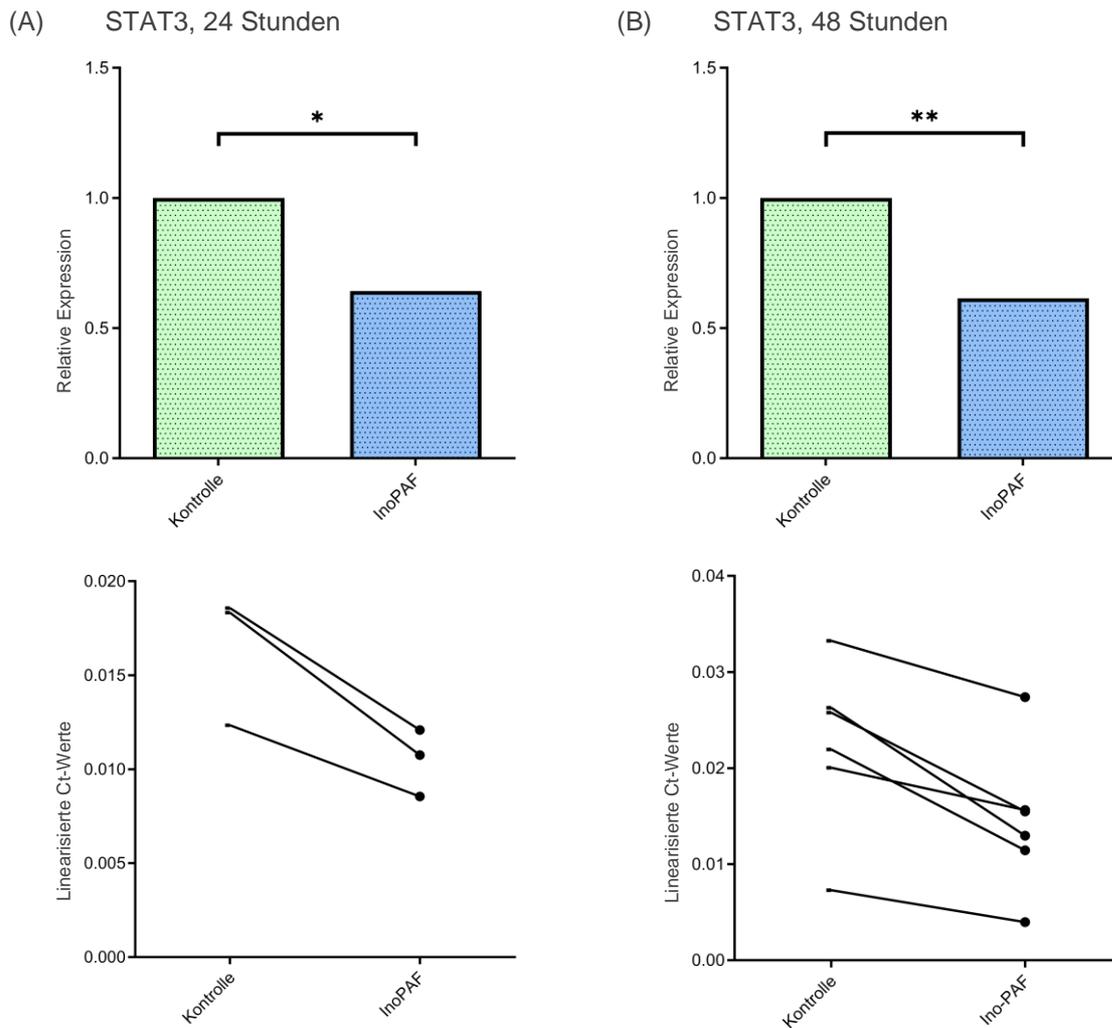


Abbildung 7: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von STAT3.

HaCaT-Zellen wurden für 24 (A) und 48 (B) Stunden mit oder ohne Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für STAT3 wurde durchgeführt. Es wurde auf GAPDH normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten Ct-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichprobe analysiert.

Oberhalb: Abgebildet sind die durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode gewonnen Mittelwerte aus drei (24 Stunden, linke Spalte) bzw. sechs (48 Stunden, rechte Spalte) Versuchen, normalisiert auf die Kontrolle. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Unterhalb: Abgebildet sind die einzelnen linearisierten Ct-Werte. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

In einem zusätzlichen Ansatz wurden HaCaT-Zellen für 24 und 48 Stunden mit oder ohne IL-6 beziehungsweise der Kombination aus IL-6 und Inositol-C2-PAF inkubiert. Wie im oben beschriebenen Versuchsaufbau wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für STAT3 durchgeführt. Es wurde auf GAPDH normalisiert und die Mittelwerte verglichen. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten Ct-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichprobe analysiert.

Nach 24 und 48 Stunden zeigten sich beim Mittelwertvergleich der Kontrolle zur Stimulation mit IL-6 kein signifikanter Unterschied in der STAT-3-mRNA-Menge (24 Stunden: insgesamt drei Versuche; $p = 0,16$; Mittelwertunterschied ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) von 1 zu 0,96; Abbildung 9A; 48 Stunden: insgesamt sechs Versuche; $p = 0,74$; Mittelwertunterschied ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) von 1 zu 0,95; Abbildung 9B).

Wurde nach 24 Stunden die Stimulation nur mit IL-6 mit der Kombinationsbehandlung aus IL-6 und Inositol-C2-PAF verglichen, so zeigte sich beim Mittelwertvergleich in insgesamt drei Versuchen ebenfalls kein signifikantes Ergebnis ($p = 0,28$; Mittelwertunterschied ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) von 1 zu 0,78; Abbildung 9A).

Nach einer Inkubation über 48 Stunden bewirkte die Kombinationsbehandlung mit IL-6 und Inositol-C2-PAF im Mittelwertvergleich von sechs Versuchen zur alleinigen Behandlung mit IL-6 eine signifikante Reduktion der STAT3-mRNA-Expression ($p = 0,01$; Mittelwertunterschied ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) von 1 zu 0,66; Abbildung 9B).

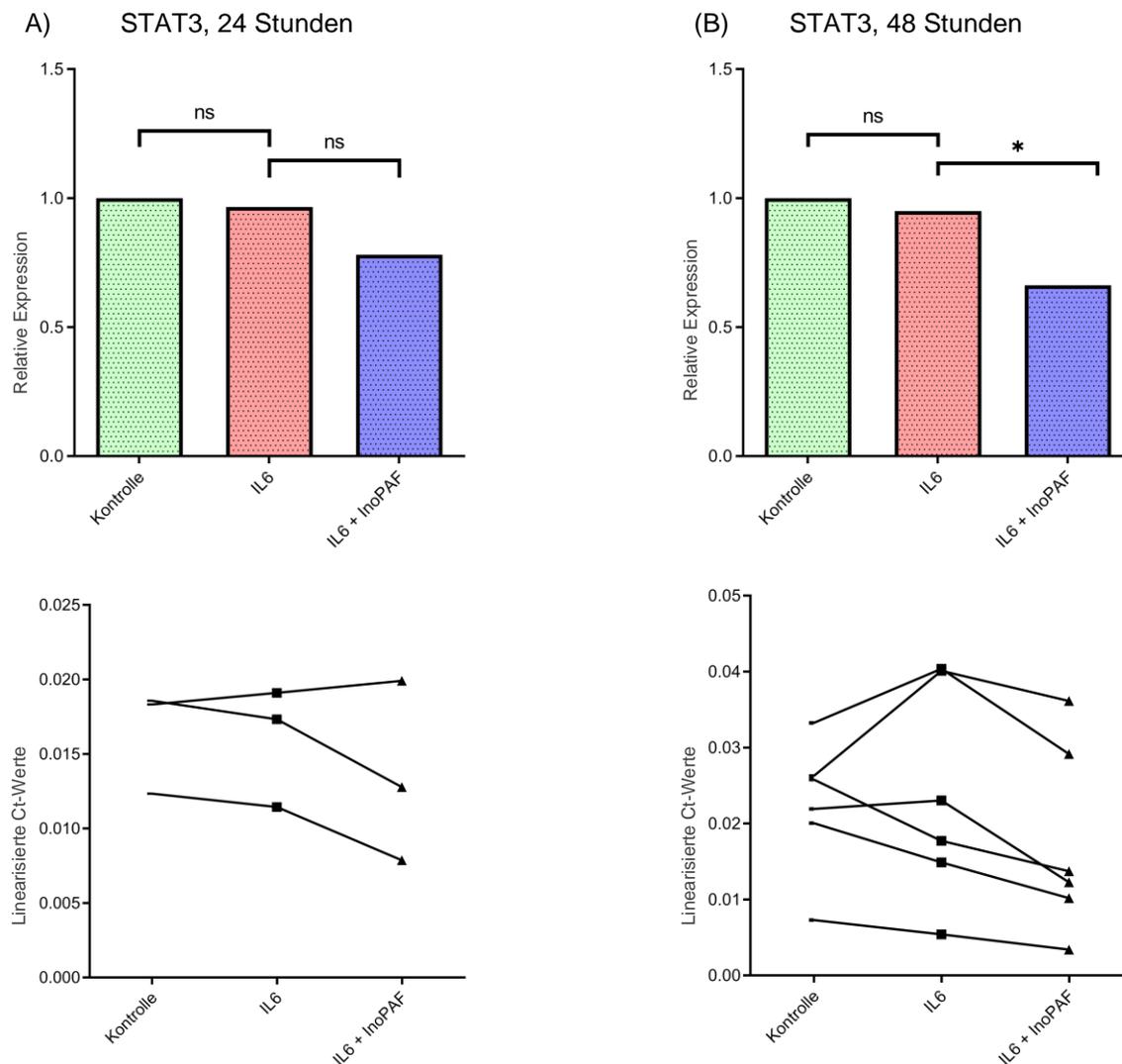


Abbildung 8: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von STAT3.

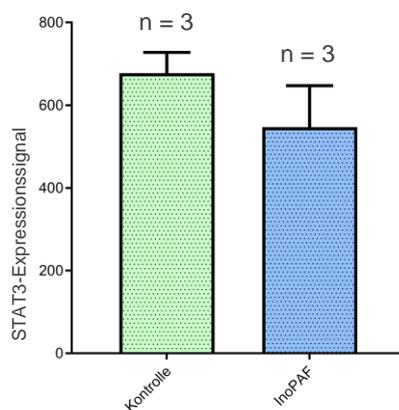
HaCaT-Zellen wurden für 24 (A) und 48 (B) Stunden mit oder ohne Interleukin-6 (IL-6) und Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für STAT3 wurde durchgeführt. Es wurde auf GAPDH normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten Ct-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichproben analysiert.

Oberhalb: Abgebildet sind die durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode gewonnen Mittelwerte aus drei (24 Stunden, linke Spalte) bzw. sechs (48 Stunden, rechte Spalte) Versuchen, normalisiert auf die Kontrolle. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$). Unterhalb: Abgebildet sind die einzelnen linearisierten Ct-Werte. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

2011 publizierten Semini et al. ihre Versuche, bei denen sie HaCaT-Zellen über 24 Stunden mit verschiedenen APLs stimulierten, unter anderem Inositol-C2-PAF [194]. Anschließend wurde mittels eines Microarrays die Expression verschiedener Gene analysiert. In einer weiteren Publikation aus dem Jahr 2014 wurden HaCaT-Zellen mit einer Kombination aus mehreren Zytokinen (IL-1a, IL-17, IL-22, TNF- α und OSM) und Inositol-C2-PAF stimuliert und erneut ein Microarray zur Genexpressionsanalyse durchgeführt [64]. Die Rohdaten wurden freundlicherweise zur Analyse zur Verfügung gestellt.

Bei der Auswertung beider Versuche zeigte sich eine Inhibition der Expression von STAT3 nach Inkubation mit Inositol-C2-PAF (Abbildung 9A). Die Inkubation mit kombinierten Zytokinen führte zu einer gesteigerten Expression. Inositol-C2-PAF reduzierte auch nach dieser Zytokinstimulation die Expression von STAT3 (Abbildung 9B).

(A) Semini et al., 2011



(B) Semini et al., 2014

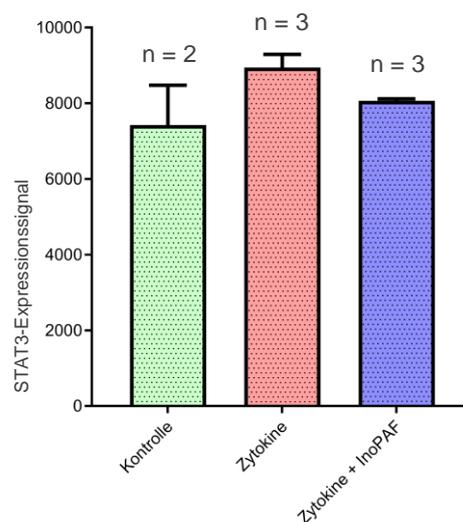


Abbildung 9: Der Einfluss von Zytokinen und Inositol-C2-PAF auf STAT3, Auswertung von Primärdaten von Semini et al.

HaCaT-Zellen wurden für 24 Stunden mit oder ohne eine Zytokinmischung (IL-1a, IL-17, IL-22, TNF- α und OSM) und Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. Die Expression von STAT3 wurde mittels Microarray quantifiziert. Angegeben ist die Anzahl der biologischen Replikate (n) und dargestellt sind deren Mittelwerte mit Standardabweichung. Jedes biologische Replikat entspricht 12 (A) bzw. 10 (B) technischen Replikaten. Primärdaten der folgenden Publikationen wurden ausgewertet:

(A) Semini G, Klein A, Danker K. Impact of alkylphospholipids on the gene expression profile of HaCaT cells. *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21(7):375-387. doi: 10.1097/FPC.0b013e32834549b9

(B) Semini G, Hildmann A, Klein A, et al. Inositol-C2-PAF down-regulates components of the antigen presentation machinery in a 2D-model of epidermal inflammation. *Biochem Pharmacol*. 2014;87(3):477-488. doi:10.1016/j.bcp.2013.11.012.

3.2. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705

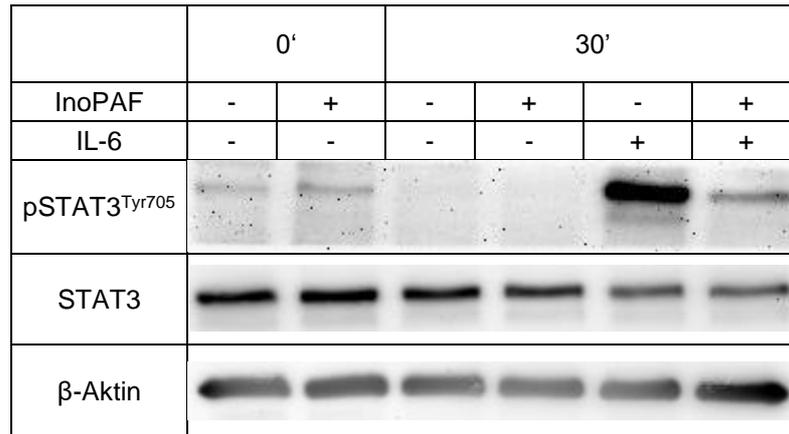
3.2.1. Analyse der Proteinexpression und der Phosphorylierung nach Kurzzeitstimulation durch Interleukin-6

Um zu überprüfen, ob Inositol-C2-PAF einen Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT3 hat und somit die Aktivität des Transkriptionsfaktors beeinflusst, wurden HaCaT-Zellen für eine Stunde mit oder ohne Inositol-C2-PAF inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 Minuten mit oder ohne IL-6 und Inositol-C2-PAF inkubiert. Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen pSTAT3^{Tyr705} und gegen β -Aktin wurden durchgeführt. Die optische Dichte wurde quantifiziert und die Werte für pSTAT3^{Tyr705} auf β -Aktin und auf STAT3 normalisiert. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei Versuchen. Es wurde jeweils auf die Vergleichsgruppe normalisiert und die Mittelwerte mit Hilfe des Einstichproben-t-Tests analysiert.

Nach 30-minütiger Inkubation mit IL-6 zeigte sich beim Mittelwertvergleich mit der Kontrolle in insgesamt drei Versuchen eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 um mehr als das 90-fache ($p = 0,01$; Mittelwertunterschied von 1 zu 91,8; Abbildung 11).

Erfolgte eine einstündige Vorinkubation mit Inositol-C2-PAF und eine kombinierte Inkubation mit Inositol-C2-PAF und IL-6, wurde die Phosphorylierung im Mittelwertvergleich zur alleinigen Inkubation mit IL-6 in insgesamt drei Versuchen sehr signifikant auf ein Fünftel reduziert ($p = 0,0035$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,2; Abbildung 11).

(A)



(B) pSTAT3^{Tyr705}

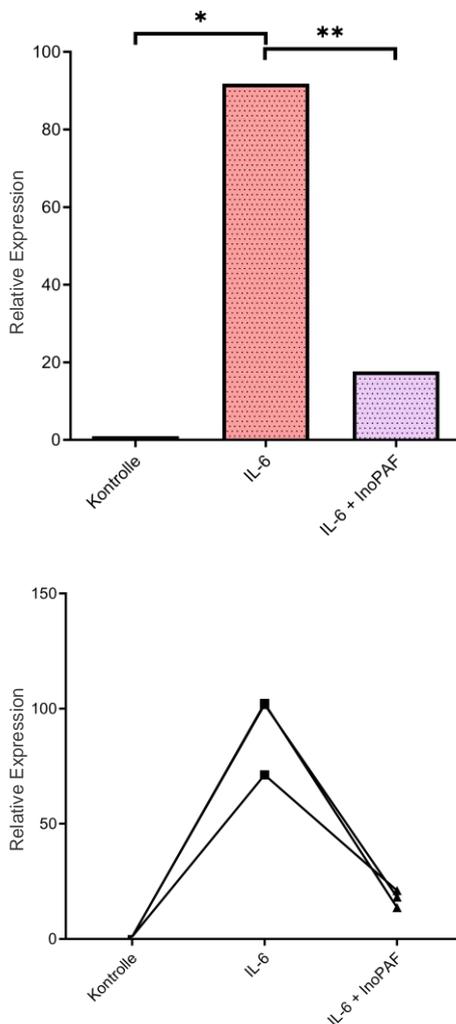


Abbildung 10: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf pSTAT3^{Tyr705} auf Proteinebene nach 30 Minuten.

HaCaT-Zellen wurden für eine Stunde mit (+) oder ohne (-) Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 Minuten mit oder ohne Interleukin-6 (IL-6) und Inositol-C2-PAF inkubiert. Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen pSTAT3^{Tyr705}, STAT3 und β-Aktin wurden durchgeführt.

(A) Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot aus n = 3.

(B) Die optische Dichte der Signale der Western Blots wurde quantifiziert und die Werte für pSTAT3^{Tyr705} auf β-Aktin und STAT3 normalisiert. Oberhalb: Abgebildet sind die Mittelwerte aus sechs Versuchen, normalisiert auf die Kontrolle. Zur statistischen Auswertung wurde jeweils auf die Vergleichsgruppe normalisiert und die Mittelwerte mit Hilfe des Einstichproben-t-Tests analysiert. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (* = p < 0,05; ** = p < 0,01). Unterhalb: Abgebildet sind die einzelnen Ergebnisse normalisiert auf die Kontrolle. Einzelne Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

3.2.2. Analyse der Proteinexpression und der Phosphorylierung nach Langzeitstimulation durch Interleukin-6

Um zu ermitteln, ob der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung über einen längeren Zeitraum persistiert, wurden HaCaT-Zellen für 24 und 48 Stunden mit wechselnden Kombinationen aus Inositol-C2-PAF und Interleukin-6 inkubiert. Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen pSTAT3^{Tyr705}, STAT3 und β -Aktin wurden durchgeführt. Die optische Dichte der Signale der Western Blots wurde quantifiziert und die Werte für pSTAT3^{Tyr705} auf β -Aktin und dann auf STAT3 normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurde auf die jeweilige Vergleichsgruppe normalisiert und die Ergebnisse mittels des Einstichproben-t-Tests analysiert.

Nach Inkubation mit Inositol-C2-PAF für 24 und 48 Stunden zeigte sich zu beiden Zeitpunkten im Mittelwertvergleich zur Kontrolle eine hochsignifikante Reduktion der Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 in jeweils fünf Versuchen (24 Stunden: $p < 0,0001$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,25; Abbildung 11B; 48 Stunden: $p = 0,004$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,27; Abbildung 11C).

Im Vergleich zur Kontrolle führte die Stimulation mit IL-6 nach 24 und 48 Stunden im Mittelwertvergleich in jeweils fünf Versuchen zu einer signifikanten, fast 4-fachen Steigerung der Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 (24 Stunden: $p = 0,03$; Mittelwertunterschied von 1 zu 3,8; Abbildung 11B; 48 Stunden: $p = 0,04$; Mittelwertunterschied von 1 zu 3,8; Abbildung 11C).

Die durch IL-6 induzierte Phosphorylierung konnte durch gleichzeitige Inkubation mit Inositol-C2-PAF über 24 und 48h in jeweils fünf Versuchen signifikant reduziert werden (24 Stunden: $p = 0,048$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,6; Abbildung 11B; 48 Stunden: $p = 0,004$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,4; Abbildung 11C).

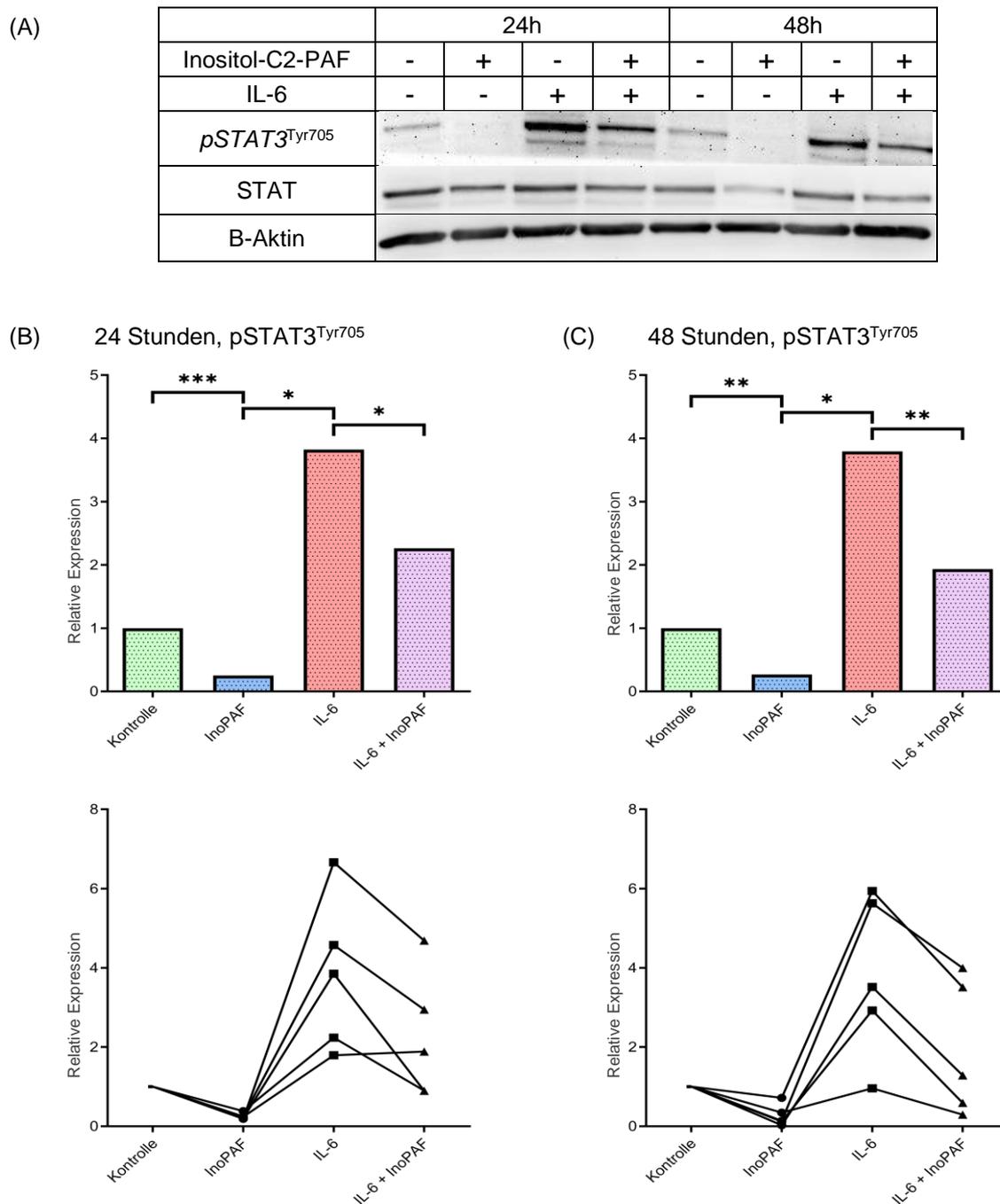


Abbildung 11: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf $pSTAT3^{Tyr705}$ auf Proteinebene.

HaCaT-Zellen wurden für 24 (A) und 48 (B) Stunden mit (+) oder ohne (-) Interleukin-6 (IL-6) bzw. Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen $pSTAT3^{Tyr705}$, STAT3 und β -Aktin wurden durchgeführt.

(A): Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 5$.

(B) und (C) Die optische Dichte der Signale der Western Blots wurde quantifiziert und die Werte für $pSTAT3^{Tyr705}$ auf β -Aktin und STAT3 normalisiert. Oberhalb: Abgebildet sind die Mittelwerte aus sechs Versuchen, normalisiert auf die Kontrolle. Zur statistischen Auswertung wurde jeweils auf die Vergleichsgruppe normalisiert und die Mittelwerte mit Hilfe des Einstichproben-t-Tests analysiert. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Unterhalb: Abgebildet sind die einzelnen Ergebnisse normalisiert auf die Kontrolle. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

3.2.3. Untersuchung der beobachteten Einflüsse auf STAT3-Expression und -Phosphorylierung in Anwesenheit weiterer löslicher Mediatoren

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Einflüsse von Inositol-C2-PAF auf die Proteinexpression und Phosphorylierung von STAT3 auf einer gezielten Beeinflussung des IL-6-Signalwegs beruht, wurden die oben gezeigten Versuche mit Kurz- und Langzeitstimulation durch weitere lösliche Mediatoren wiederholt.

HaCaT-Zellen wurden zunächst für eine Stunde mit oder ohne Inositol-C2-PAF inkubiert. Anschließend wurden sie für 15, 30 und 60 Minuten mit wechselnden Kombinationen aus Inositol-C2-PAF und OSM oder EGF inkubiert. Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3 und pSTAT3^{Tyr705} wurden durchgeführt.

Nach einer Inkubation OSM oder EGF zeigte sich nach 15 und nach 30 Minuten eine Stimulation der Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 durch beide untersuchten Zytokine. Wurde zusätzlich mit Inositol-C2-PAF inkubiert, war eine Reduzierung der Phosphorylierung zu erkennen (Abbildung 12).

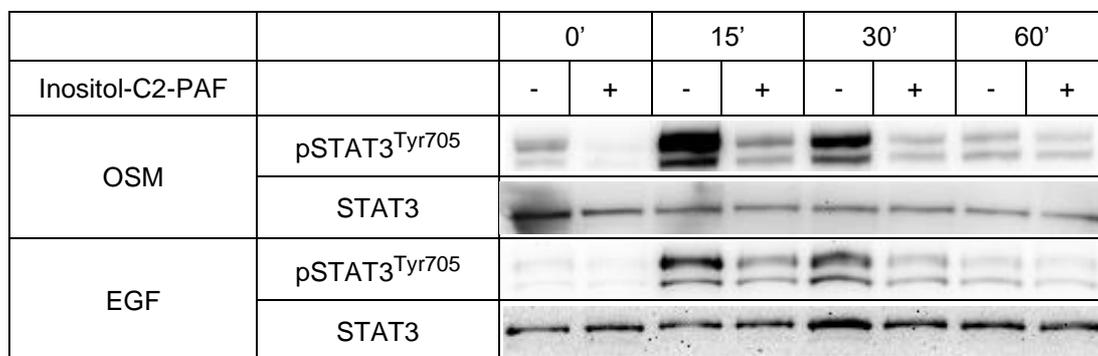


Abbildung 12: Der Einfluss von verschiedenen Zytokinen und Inositol-C2-PAF auf pSTAT3^{Tyr705} im Vergleich zu STAT3 auf Proteinebene nach kurzer Stimulation.

HaCaT-Zellen wurden für eine Stunde mit Inositol-C2-PAF inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 0, 15, 30 oder 60 Minuten mit Oncostatin M (OSM) oder Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) jeweils mit (+) oder ohne (-) Inositol-C2-PAF inkubiert. Immunoblots mit Antikörpern gegen pSTAT3^{Tyr705} und STAT3 wurde durchgeführt. Diese Versuche wurden zweimal durchgeführt, abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch nach der Langzeitinkubation mit OSM und EGF beobachtet. HaCaT-Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit wechselnden Kombinationen aus Inositol-C2-PAF und OSM oder EGF inkubiert. Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3 und pSTAT3^{Tyr705} wurden durchgeführt. Nach 48 Stunden führten beide untersuchten Zytokine zu einer gesteigerten Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705. Inositol-C2-PAF konnte die Phosphorylierung nach Stimulation mit beiden untersuchten Zytokinen reduzieren (Abbildung 13).

		24h				48h			
Inositol-C2-PAF		-	+	-	+	-	+	-	+
Zytokin		-	-	+	+	-	-	+	+
OSM	pSTAT3 ^{Tyr705}								
	STAT3								
EGF	pSTAT3 ^{Tyr705}								
	STAT3								

Abbildung 13: Der Einfluss von verschiedenen Oncostatin M, Epidermalem Wachstumsfaktor und Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705.

HaCaT-Zellen wurden für 24 und/oder 48 Stunden mit (+) oder ohne (-) Oncostatin M (OSM) oder Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) und mit oder ohne Inositol-C2-PAF inkubiert. Ein Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen pSTAT3^{Tyr705} und STAT3 wurde durchgeführt. Diese Versuche wurden zweimal durchgeführt, abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot.

3.3. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT3 und pSTAT3

Um zu untersuchen, ob der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung von STAT3 eine veränderte nukleäre Lokalisation zur Folge hat, wurde mittels Immunfluoreszenz die intrazelluläre Lokalisation von STAT3 und pSTAT3^{Tyr705} verfolgt. Für diese Versuche wurde zur Stimulation OSM verwendet, da dieses Zytokin in den oben gezeigten Versuchen bei gleicher Konzentration eine stärkere Stimulation der Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 als IL-6 zeigte.

HaCaT-Zellen wurden für eine Stunde mit oder ohne Inositol-C2-PAF vorinkubiert. Anschließend wurden sie für 15 Minuten mit Medium ohne weitere Zugabe, mit OSM oder mit einer Kombination aus OSM und Inositol-C2-PAF stimuliert. Spezifische Antikörper und sekundäre Fluoreszenzantikörper wurden verwendet, um STAT3 (rot), pSTAT3^{Tyr705} (grün) und A-T-reiche Abschnitte der DNA (blau) darzustellen.

Ohne Stimulus war STAT3 im Zytoplasma sichtbar, zeigte aber in den Zellkernen keine deutliche Anreicherung. Nach Stimulation nahm sowohl die Konzentration von STAT3 als auch von pSTAT3^{Tyr705} im Zellkern deutlich zu. Unter der Behandlung mit OSM in Kombination mit Inositol-C2-PAF sah man nur eine leichte Anreicherung im Zellkern (Abbildung 14).

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde die Wirkung von Inositol-C2-PAF mit STA-21 verglichen, für welches bereits nachgewiesen ist, dass es die nukleäre Lokalisation von STAT3 inhibiert. HaCaT-Zellen wurden für eine Stunde mit Dimethylsulfoxid (DMSO), Inositol-C2-PAF oder STA-21 inkubiert. Danach wurden sie für 15 Minuten mit oder ohne OSM. Mittels Fluoreszenzantikörpern wurden STAT3 und A-T-reiche Abschnitte der DNA (nicht dargestellt) sichtbar gemacht.

Nach Stimulation mit OSM und OSM in Kombination mit DMSO kommt es zu einer Anreicherung von STAT im Zellkern. Sowohl Inositol-C2-PAF als auch STA-21 reduzieren die nukleäre Lokalisation. Dabei ist nach der Stimulation mit Inositol-C2-PAF kaum noch nukleär lokalisiertes STAT3 erkennbar (Abbildung 15).

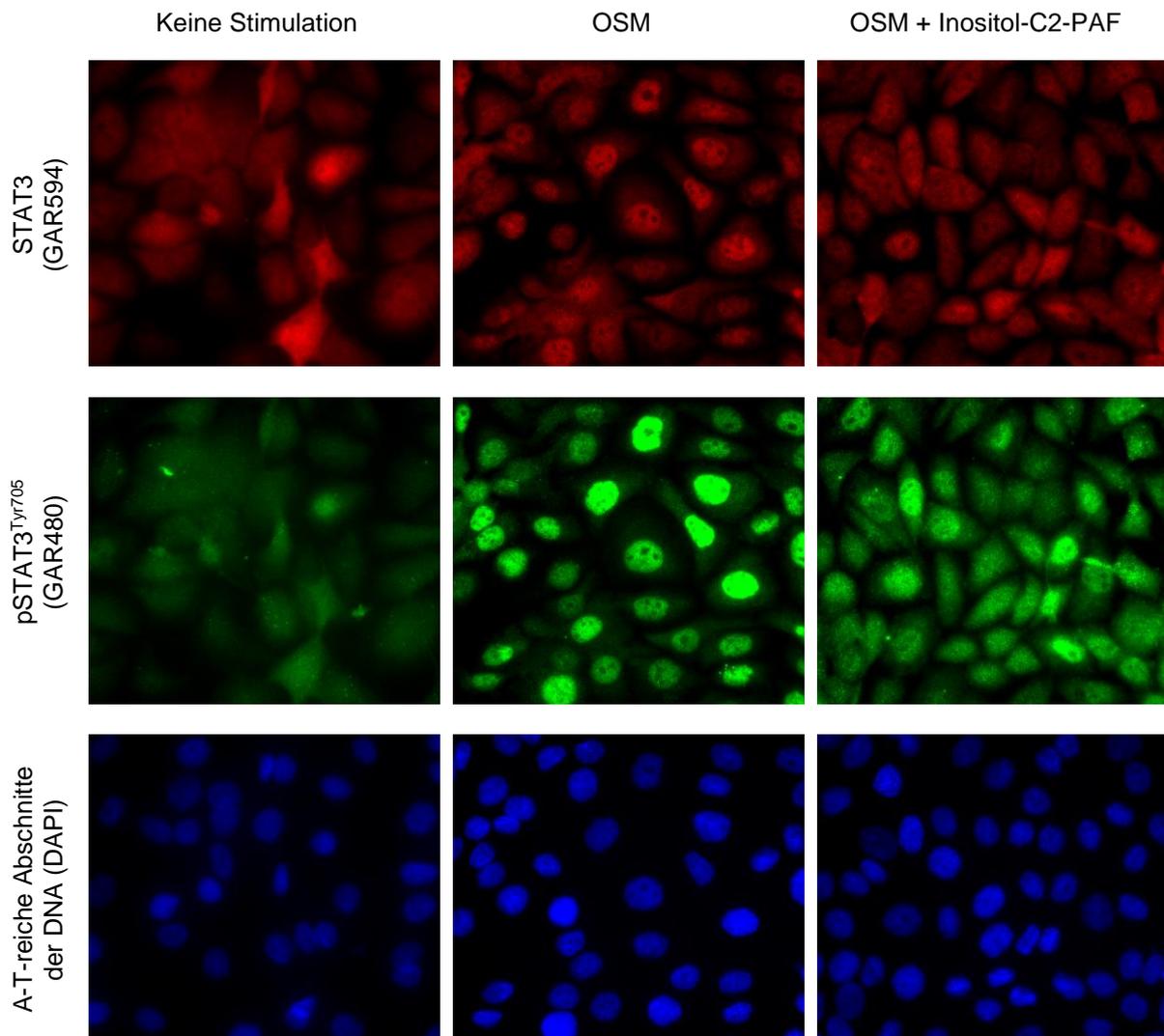


Abbildung 14: Der Einfluss von verschiedenen Zytokinen und Inositol-C2-PAF auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT3 und pSTAT3^{Tyr705}.

HaCaT-Zellen wurden für eine Stunde mit oder ohne Inositol-C2-PAF vorinkubiert. Anschließend wurden sie für 15 Minuten ohne weitere Zugabe, mit OSM oder mit einer Kombination aus OSM und Inositol-C2-PAF stimuliert. Spezifische Fluoreszenzantikörper wurden verwendet, um STAT3 (rot), pSTAT3^{Tyr705} (grün) und A-T-reiche Abschnitte der DNA (blau) darzustellen.

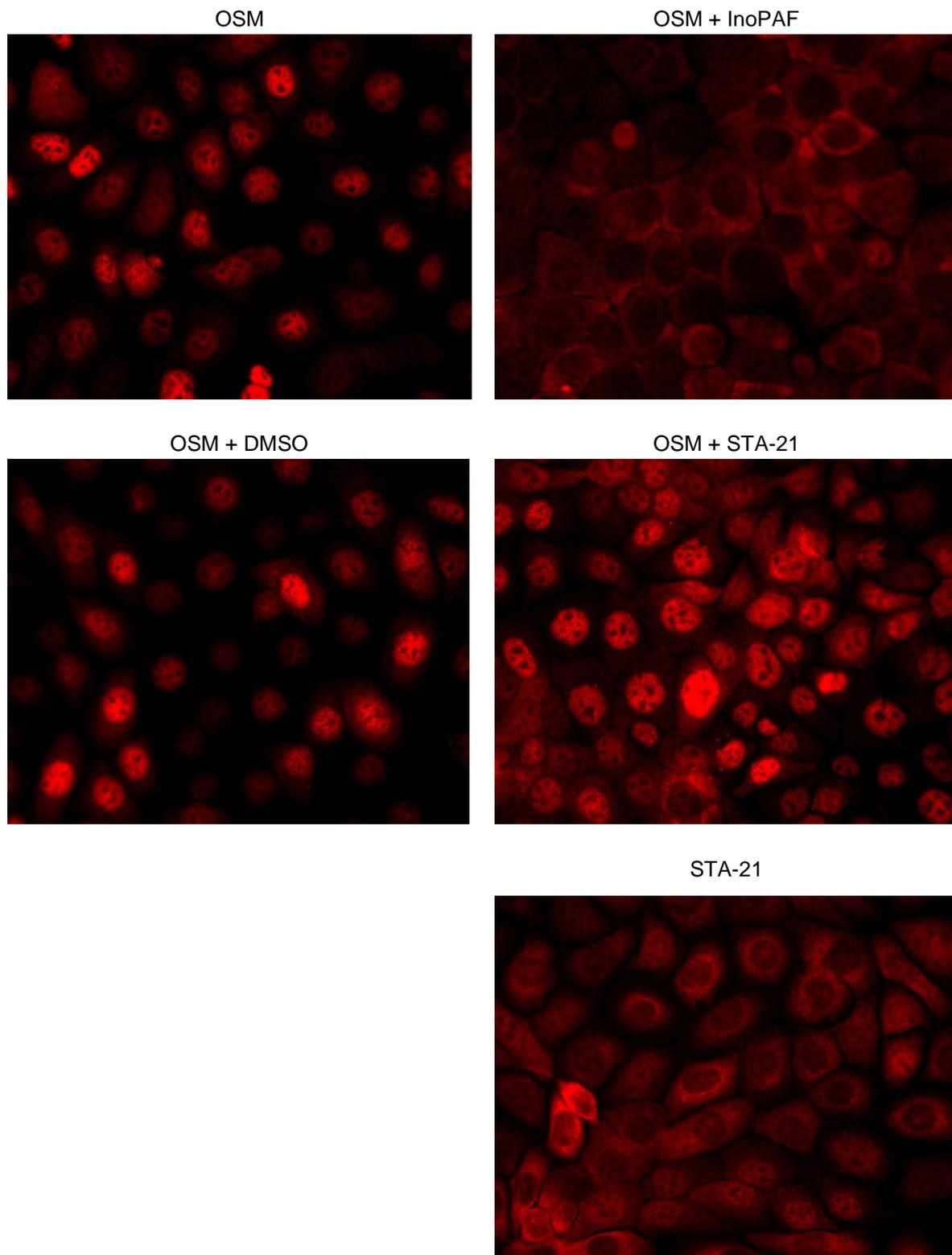


Abbildung 15: Der Einfluss von Inhibitoren des STAT3-Pathways auf die intrazelluläre Lokalisation von STAT3.

HaCaT-Zellen wurden für eine Stunde mit Dimethylsulfoxid (DMSO), Inositol-C2-PAF (InoPAF) oder STA-21 inkubiert. Danach wurden sie für 15 Minuten mit Oncostatin M (OSM) oder mit Medium inkubiert. Mittels spezifischer Fluoreszenzantikörper wurden STAT3 und A-T-reiche Abschnitte der DNA (nicht dargestellt) sichtbar gemacht.

3.4. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Expression STAT3-abhängiger Gene

Durch die folgende Versuchsreihe wurde untersucht, ob aus der Beeinflussung der ersten Schritte der Aktivierung von STAT3, nämlich der Phosphorylierung und der nukleären Lokalisation, ebenfalls eine differentielle Genexpression resultiert. Dazu wurden HaCaT-Zellen für 24 oder 48 Stunden in An- oder Abwesenheit von Inositol-C2-PAF inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für die STAT3-abhängigen Gene BIRC5/Survivin, S100A7, CCND1 und IL-6 sowie mit spezifischen Primern für GAPDH durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurde jeweils auf die Vergleichsgruppe normalisiert und die linearisierten CT-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichproben analysiert.

Durch Behandlung mit Inositol-C2-PAF zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Reduktion der Expression von BIRC5/Survivin, S100A7, CCND1 und IL-6.

Nach 24 und 48 Stunden Inkubation mit Inositol-C2-PAF wurde eine signifikante Reduktion der Genexpression von BIRC5/Survivin beobachtet (24 Stunden: drei Versuche; $p = 0,01$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 0,28; Abbildung 16A; 48 Stunden: vier Versuche; $p = 0,0004$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 0,1; Abbildung 16B).

Nach 48 Stunden Inkubation mit Inositol-C2-PAF zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle in insgesamt jeweils drei Versuchen eine signifikante Reduktion der Genexpression von S100A7 ($p = 0,015$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 0,2; Abbildung 17A) und CCND1 ($p = 0,018$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 0,62; Abbildung 17B).

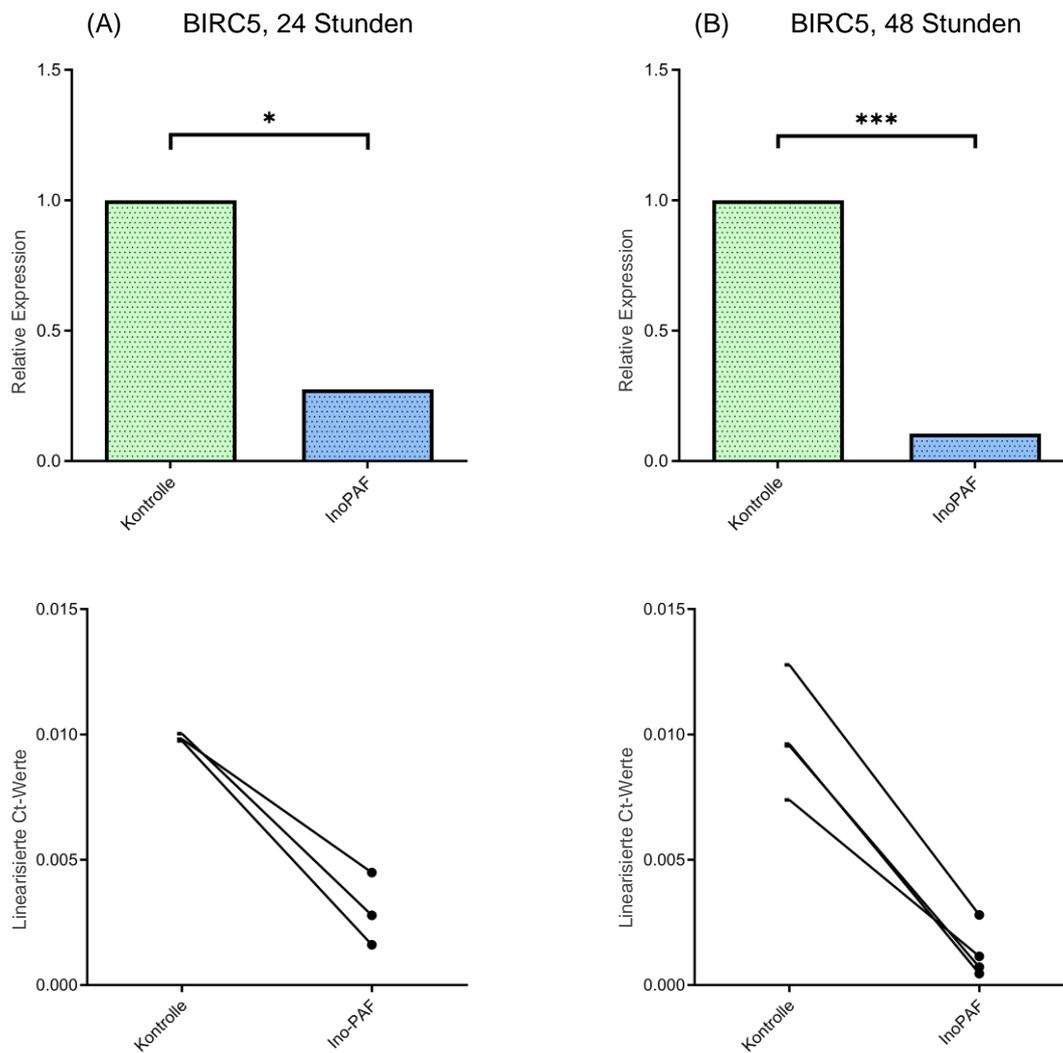


Abbildung 16: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von BIRC5.

HaCaT-Zellen wurden für 24 (A) und 48 (B) Stunden mit oder ohne Inositol-C2-PAF inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für BIRC5/Survivin durchgeführt. Es wurde auf GAPDH und auf die Kontrolle normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten Ct-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichprobe analysiert.

Oberhalb: Abgebildet sind die durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode gewonnenen Mittelwerte aus drei (24 Stunden, linke Spalte) bzw. vier (48 Stunden, rechte Spalte) Versuchen. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$). Unterhalb: Abgebildet sind die einzelnen linearisierten Ct-Werte. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

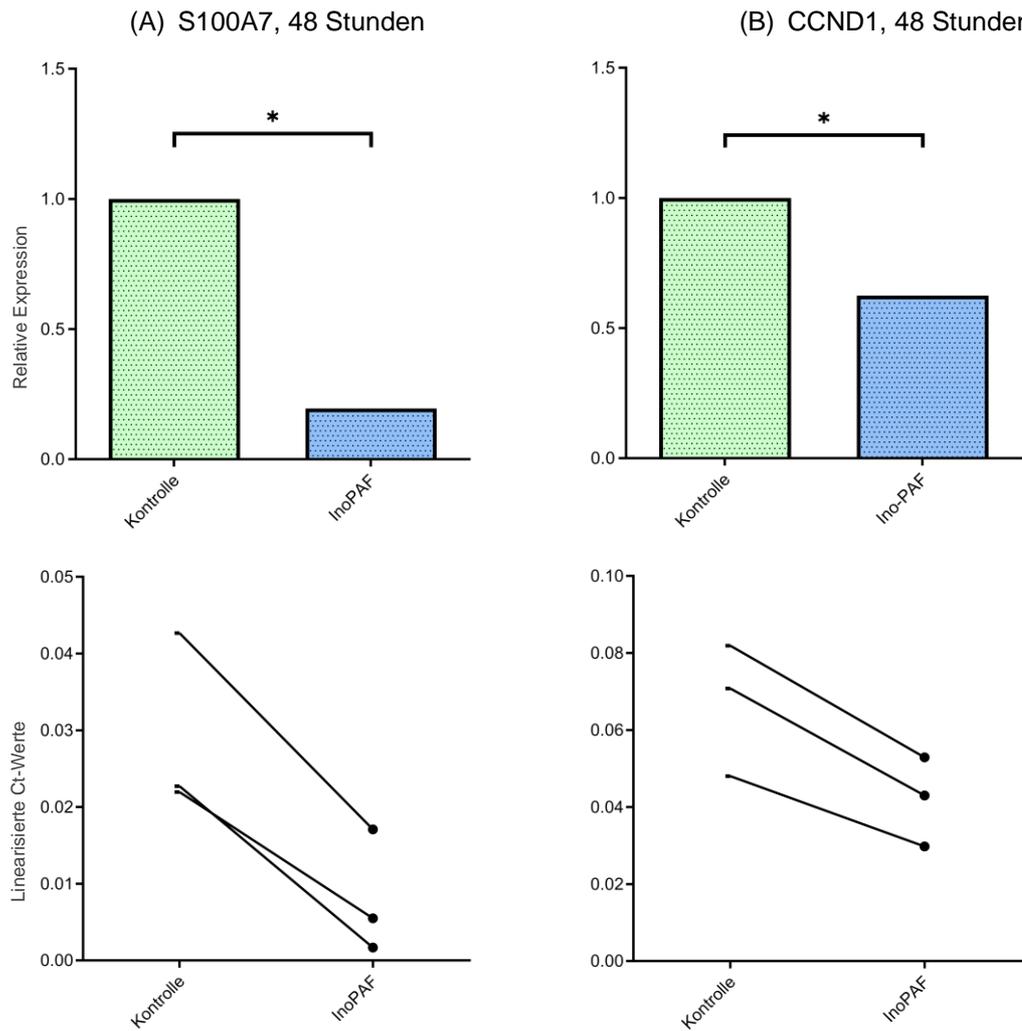


Abbildung 17: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von S100A7 und CCND1.

HaCaT-Zellen wurden für 48 Stunden mit oder ohne Inositol-C2-PAF inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit Primern für S100A7 (A) oder CCND1 (B) durchgeführt. Es wurde auf GAPDH und auf die Kontrolle normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten Ct-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichprobe analysiert.

Oberhalb: Abgebildet sind die durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode gewonnen Mittelwerte aus jeweils drei Versuchen. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (* = $p < 0,05$). Unterhalb: Abgebildet sind die einzelnen linearisierten Ct-Werte. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

Der Einfluss einer Stimulation mit Inositol-C2-PAF über 48 Stunden auf die Genexpression von IL-6 wurde dargestellt, um eine disruptive Wirkung auf ein positiv-selbstverstärkendes Zytokinsignal im psoriatischen Hautmilieu zu untersuchen.

Es zeigte sich im Mittelwertvergleich von der Kontrolle zur Stimulation mit Inositol-C2-PAF in insgesamt vier Versuchen eine signifikante Reduktion der Genexpression von IL-6 ($p = 0,014$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 0,24; Abbildung 18).

Außerdem wurden bislang nicht publizierte Versuche der AG Danker, Institut für Biochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin ausgewertet. In diesen Versuchen wurden HaCaT-Zellen für 24 Stunden in An- und Abwesenheit eines Zytokinmix, bestehend aus IL-1 α , IL-17, IL-22, TNF- α und OSM, und Inositol-C2-PAF inkubiert. Auch hier wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für Interleukin-6 sowie GAPDH durchgeführt. Die Ergebnisse für Interleukin-6 wurden auf GAPDH normalisiert.

Es zeigte sich eine Stimulation der Genexpression von IL-6 durch die Zytokine. Durch die gleichzeitige Inkubation mit Inositol-C2-PAF wurde die Expression auf das Niveau der Kontrolle reduziert (Abbildung 19A)

Zusätzlich wurden die Primärdaten der Stimulationsversuche von Semini et al. ausgewertet [64], bei denen in einem ähnlichen Aufbau mit einer Microarray-Analyse die Expression einer Vielzahl von Genen untersucht wurde. Auch bei diesen Versuchen stimulierten die verwendeten Zytokine (IL-1 α , IL-17, IL-22, TNF- α und OSM) die Genexpression von IL-6 in HaCaT-Zellen, während bei einer Inkubation mit Inositol-C2-PAF die Expression inhibiert wurde (Abbildung 19B).

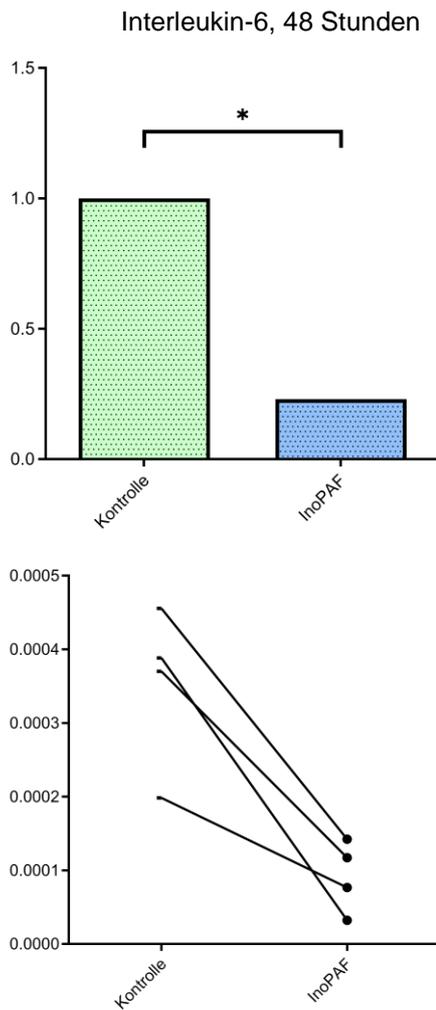


Abbildung 18: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von Interleukin-6.

HaCaT-Zellen wurden 48 Stunden mit oder ohne Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit Primern für Interleukin-6 durchgeführt. Es wurden auf GAPD und die Kontrolle normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten C_T -Werte mittels des T-Tests für verbundene Stichprobe analysiert. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (* = $p < 0,05$). Unterhalb abgebildet sind die linearisierten C_T -Werte der einzelnen Versuche. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

(A) Auswertung von bisher nicht publizierten Ergebnissen der AG Danker, Institut für Biochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin

(B) Auswertung von Primärdaten von Semini et al.

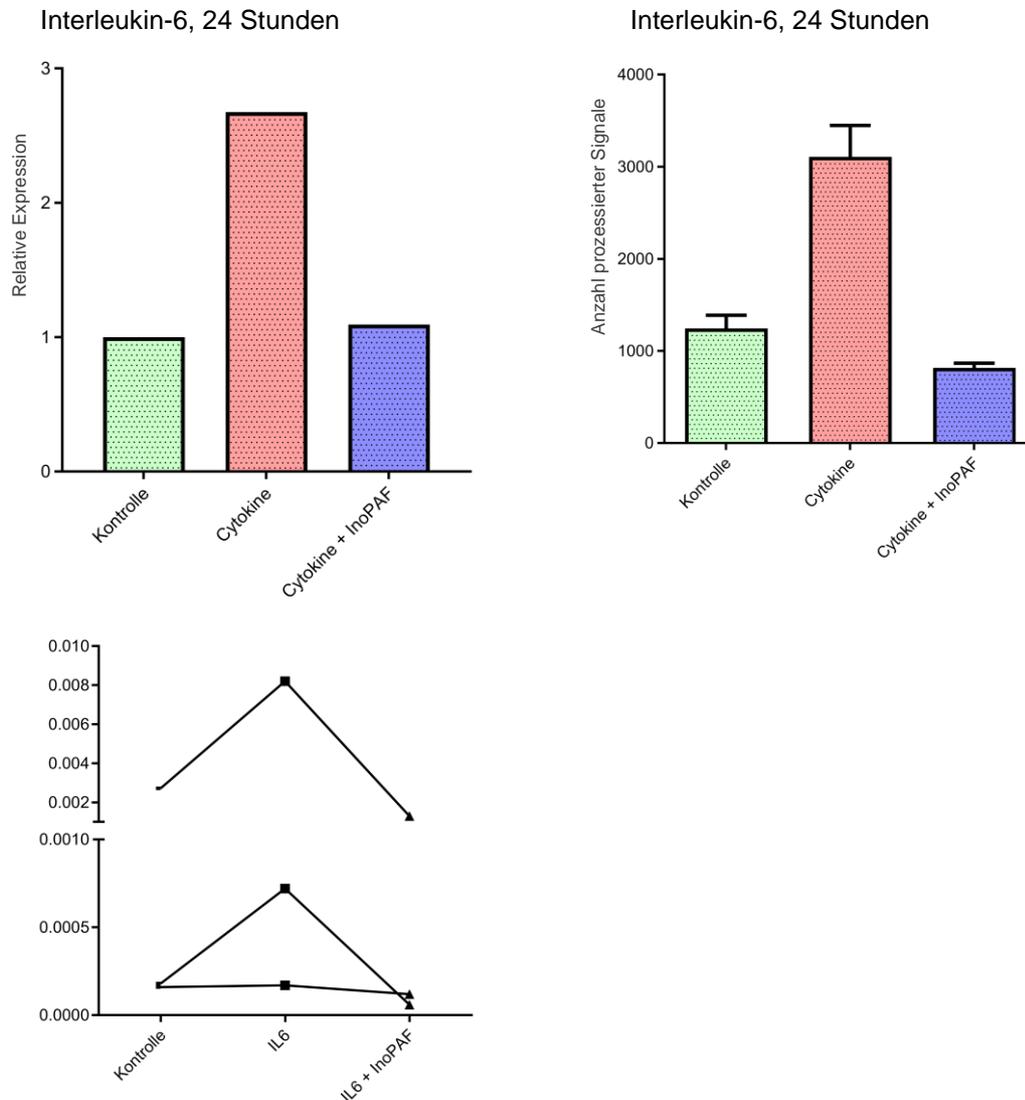


Abbildung 19: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von Interleukin-6: Untersuchungen durch andere Wissenschaftler.

(A) Versuche durchgeführt von Mitgliedern der Arbeitsgruppe (AG) Danker, Institut für Biochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin. Ergebnisse bisher nicht publiziert. HaCaT-Zellen wurden 24 Stunden mit oder ohne Zytokinmix (IL-1 α , IL-17, IL-22, TNF- α und OSM) und Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit Primern für Interleukin-6 (IL-6) durchgeführt. Es wurde auf GAPDH normalisiert und auf die Kontrolle normalisiert. Abgebildet sind die Mittelwerte von drei Versuchen. Unterhalb abgebildet sind die linearisierten CT-Werte der einzelnen Versuche. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

(B) HaCaT-Zellen wurden für 24 Stunden mit oder ohne eine Zytokinmix (IL-1 α , IL-17, IL-22, TNF- α und OSM) und Inositol-C2-PAF inkubiert. Die Expression von IL-6 wurde mittels Microarray quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte der prozessierten Signale. Angegeben ist die Anzahl der biologischen Replikate (n) und dargestellt ist deren Standardabweichung. Jedes biologische Replikat entspricht 10 technischen Replikaten. Primärdaten der Publikation:

Semini G, Hildmann A, Klein A, et al. Inositol-C2-PAF down-regulates components of the antigen presentation machinery in a 2D-model of epidermal inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2014;87(3):477-488. doi:10.1016/j.bcp.2013.11.012

Um die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf die STAT3-abhängige Genexpression in einem inflammatorischen Zytokinmilieu zu simulieren, wurden HaCaT-Zellen in An- und Abwesenheit von IL-6 und/oder Inositol-C2-PAF inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für S100A7 oder BIRC5/Survivin sowie GAPDH durchgeführt. Die Ergebnisse der spezifischen Primer wurden auf GAPDH normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten CT-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichprobe analysiert.

Bei der Untersuchung der Genexpression von S100A7 zeigte sich beim Mittelwertvergleich von der Kontrolle zur Stimulation mit IL-6 in insgesamt drei Versuchen kein signifikanter Unterschied ($p = 0,3$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 1,39; Abbildung 20A).

Im Mittelwertvergleich der Stimulation mit IL-6 zur kombinierten Stimulation mit IL-6 und Inositol-C2-PAF zeigte sich in insgesamt drei Versuchen ebenfalls kein signifikantes Ergebnis ($p = 0,31$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1,39 zu 0,43; Abbildung 20A).

Die Auswertung der Primärdaten der Microarray-Analysen von Semini et al. [64] zeigte vergleichbare Tendenzen (Abbildung 20B).

Bei der Untersuchung der Genexpression von BIRC5/Survivin zeigte sich weder nach 24 noch nach 48 Stunden beim Mittelwertvergleich von der Kontrolle zur Stimulation mit IL-6 ein signifikanter Unterschied (24 Stunden: drei Versuche; $p = 0,1$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 0,82; Abbildung 21A; 48 Stunden: vier Versuche; $p = 0,26$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 0,85; Abbildung 21B).

Nach 24 und 48 Stunden zeigte sich im Vergleich der Stimulation mit IL-6 allein zur kombinierten Stimulation mit IL-6 und Inositol-C2-PAF eine sehr signifikante Reduktion der BIRC5/Survivin-Genexpression (24 Stunden: drei Versuche; $p = 0,004$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 0,23; Abbildung 21A); 48 Stunden: vier Versuche; $p = 0,005$; Mittelwertunterschied ($2^{\Delta\Delta CT}$) von 1 zu 0,08; Abbildung 23B).

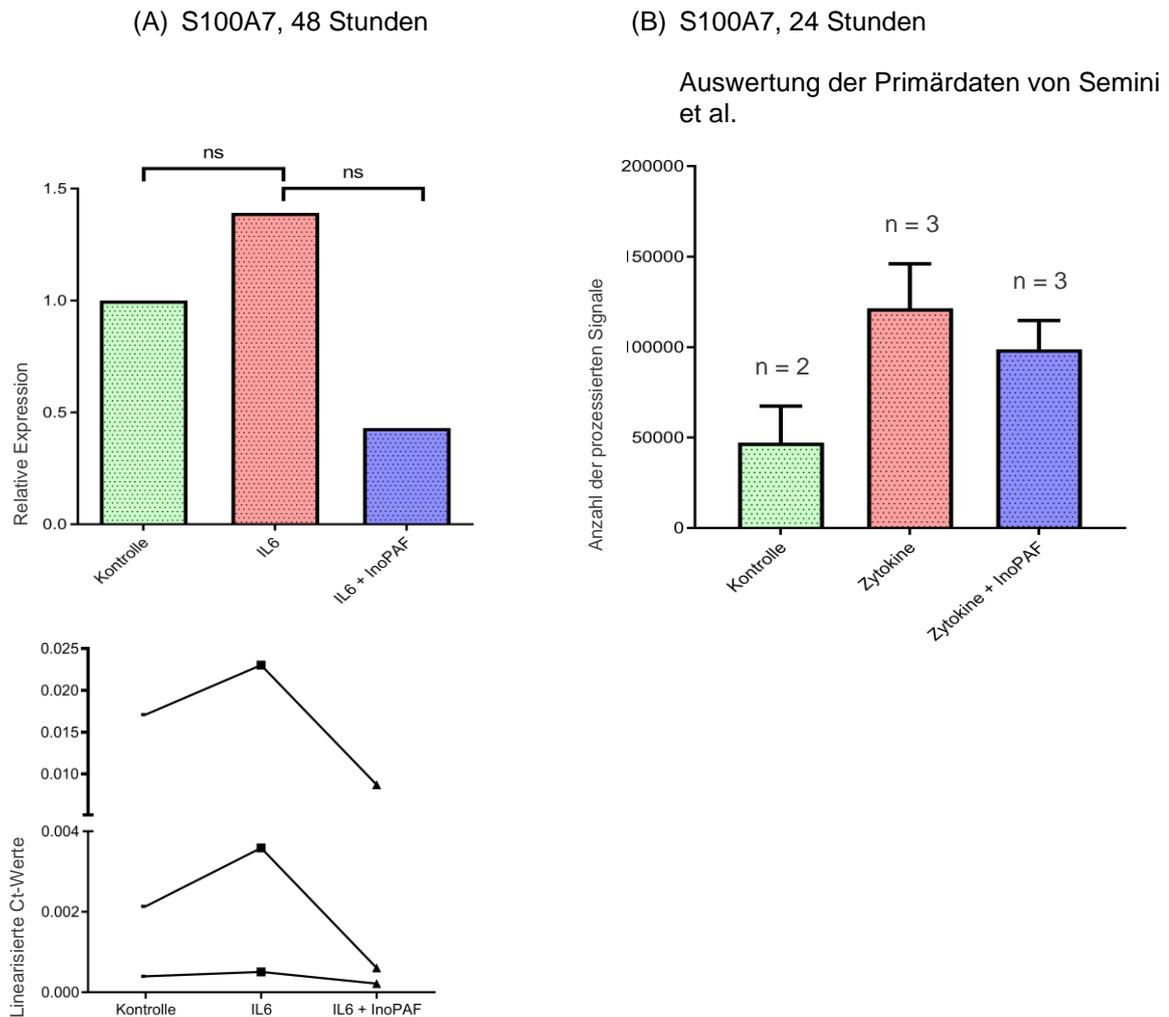


Abbildung 20: Der Einfluss von Interleukin 6 und Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von S100A7.

(A) HaCaT-Zellen wurden für 48 Stunden mit oder ohne Interleukin 6 (IL-6) und Inositol-C2-PAF inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit Primern für S100A7 durchgeführt. Es wurde auf GAPDH und jeweils auf die Vergleichsgruppe normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten Ct-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichprobe analysiert. Oberhalb: Abgebildet sind die durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode gewonnenen Mittelwerte aus drei Versuchen. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (ns = nicht signifikant). Unterhalb: Abgebildet sind die einzelnen linearisierten Ct-Werte. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

(B) Auswertung der Primärdaten von *Semini G, Hildmann A, Klein A, et al. Inositol-C2-PAF down-regulates components of the antigen presentation machinery in a 2D-model of epidermal inflammation. Biochem Pharmacol. 2014;87(3):477-488. doi:10.1016/j.bcp.2013.11.012*

HaCaT-Zellen wurden für 24 Stunden mit oder ohne eine Zytokinmischung (IL-1a, IL-17, IL-22, TNF- α und OSM) und Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. Die Expression von S100A7 wurde mittels Microarray quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte der prozessierten Signale. Angegeben ist die Anzahl der biologischen Replikate (n) und dargestellt ist deren Standardabweichung. Jedes biologische Replikate entspricht 10 technischen Replikaten.

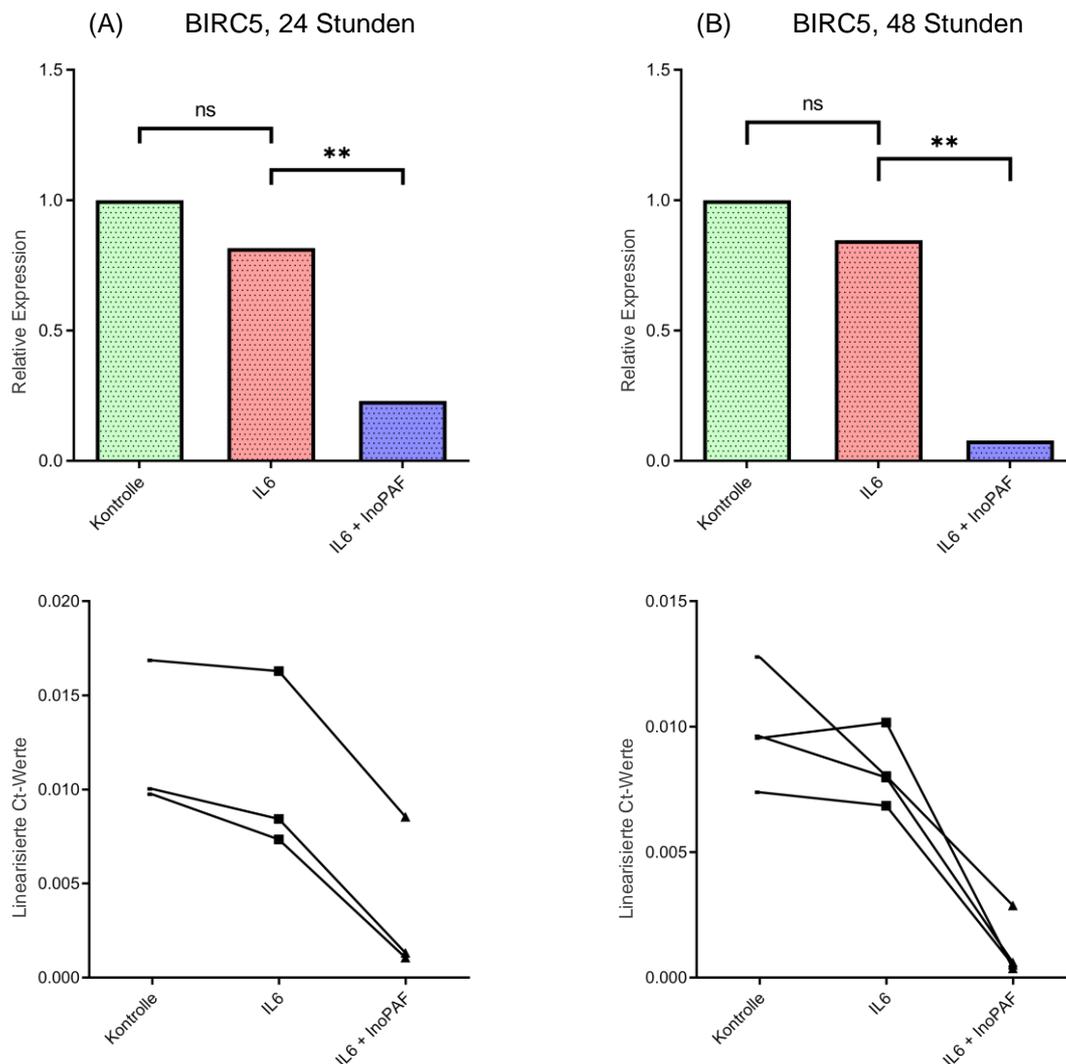


Abbildung 21: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf die Genexpression von BIRC5.

HaCaT-Zellen wurden für 24 (A) und 48 (B) Stunden mit Interleukin-6 (IL6) und mit oder ohne Inositol-C2-PAF inkubiert. mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine qRT-PCR mit spezifischen Primern für BIRC5/Survivin durchgeführt. Es wurde auf GAPDH und jeweils auf die Vergleichsgruppe normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurden die linearisierten Ct-Werte mittels des t-Tests für verbundene Stichprobe analysiert.

Oberhalb: Abgebildet sind die durch die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode gewonnen Mittelwerte aus drei (24 Stunden, linke Spalte) bzw. vier (48 Stunden, rechte Spalte) Versuchen. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$). Unterhalb: Abgebildet sind die einzelnen linearisierten Ct-Werte. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

3.5. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf AKT

3.5.1. Der Einfluss auf AKT auf Proteinebene

In der folgenden Versuchsreihe wurde untersucht, ob Inositol-C2-PAF die Aktivierung von AKT beeinflusst. HaCaT-Zellen wurden dazu für 24 und 48 Stunden mit wechselnden Kombinationen aus Inositol-C2-PAF und IL-6 inkubiert. Ein Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen AKT und β -Aktin wurde durchgeführt. Die optische Dichte der Blots wurde quantifiziert und die Werte für AKT auf β -Aktin normalisiert und zur statistischen Analyse auf die jeweilige Vergleichsgruppe normalisiert. Die Ergebnisse wurden mittels des Einstichproben-t-Tests analysiert.

Eine Inkubation von HaCaT-Zellen mit IL-6 allein hatte im Vergleich zur Kontrolle weder nach 24 noch nach 48 Stunden einen signifikanten Effekt auf die Gesamtproteinmenge von AKT (24 Stunden: vier Versuche; $p = 0,13$; Mittelwertunterschied von 1 zu 1,1; Abbildung 22B; 48 Stunden: 3 Versuche; $p = 0,08$; Mittelwertunterschied von 1 zu 1,2; Abbildung 22C).

Inositol-C2-PAF reduzierte die AKT-Proteinexpression sowohl ohne als auch bei gleichzeitiger Stimulation mit IL-6 nach 24 und 48 Stunden. Beim Vergleich der Stimulation mit Inositol-C2-PAF zur Kontrolle zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proteinmenge von AKT nach 24 und 48 Stunden (24 Stunden: vier Versuche; $p = 0,049$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,62; Abbildung 22B; 48 Stunden: drei Versuche; $p = 0,012$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,54; Abbildung 22C).

Vergleicht man die Stimulation durch IL-6 allein mit der kombinierten Stimulation durch IL-6 und Inositol-C2-PAF, so zeigte sich nach 24 und 48 Stunden eine signifikante Reduktion der Proteinmenge von AKT (24 Stunden: vier Versuche; $p = 0,019$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,59; Abbildung 22B; 48 Stunden: drei Versuche; $p = 0,03$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,64; Abbildung 22C).

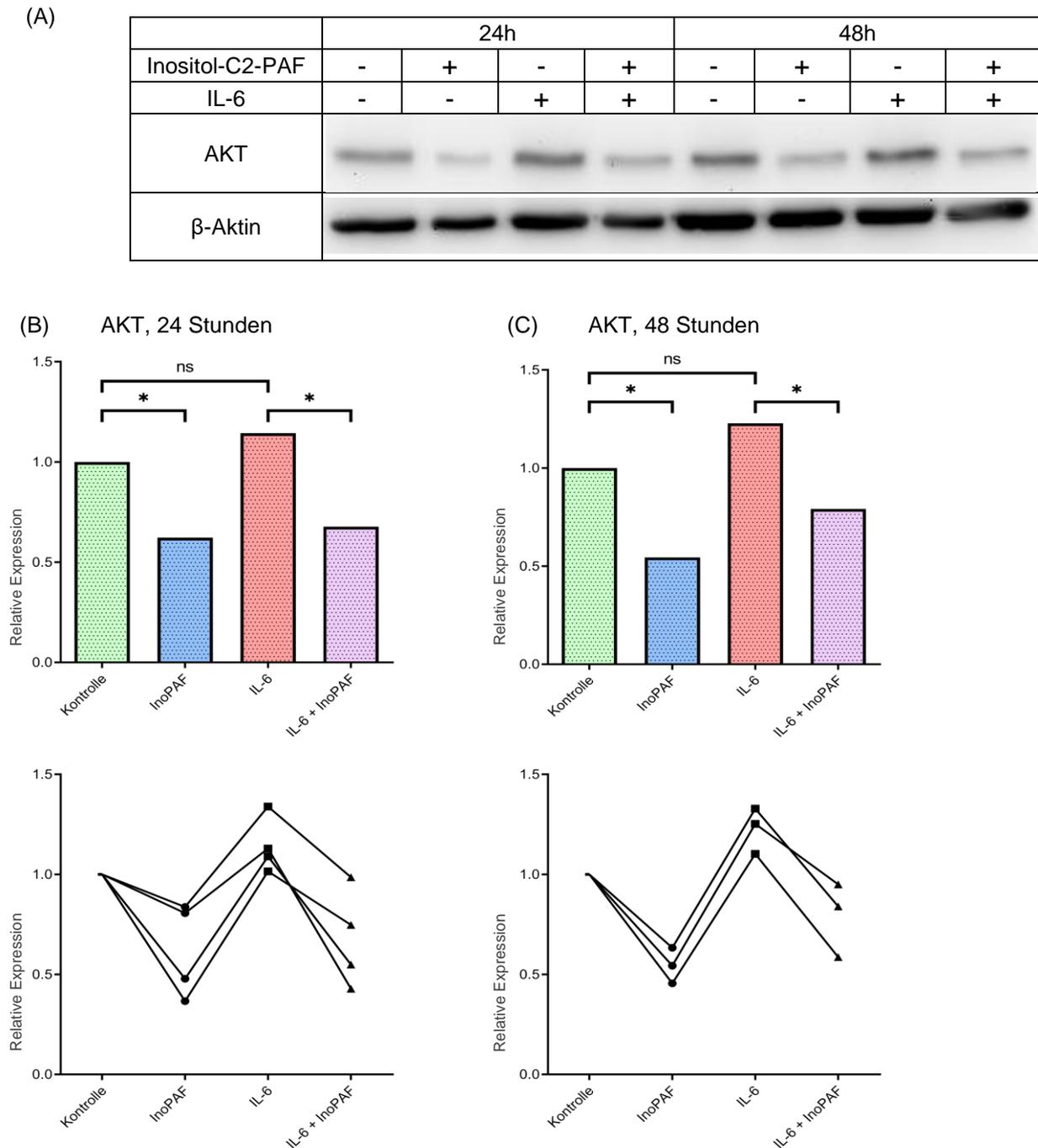


Abbildung 22: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf AKT auf Proteinebene.

HaCaT-Zellen wurden für 24 (B) und 48 (C) Stunden mit oder ohne Interleukin-6 (IL-6) und Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. Ein Immunoblot mit Antikörpern gegen AKT und β -Aktin wurde durchgeführt. Die optische Dichte wurde quantifiziert und die Werte für AKT auf β -Aktin normalisiert. Im Anschluss wurden die Werte auf die Kontrolle normalisiert.

(A) Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 3$.

(B) und (C) Abgebildet sind die Mittelwerte aus vier (A) bzw. drei (B) Versuchen. Es wurde jeweils auf die Vergleichsgruppe normalisiert und die Mittelwerte mittels Einstichproben-t-Tests analysiert. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Jeweils unterhalb abgebildet sind die einzelnen Ergebnisse normalisiert auf die Kontrolle. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

3.5.2. Der Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT an Ser473 nach Kurzzeitstimulation

Durch die folgenden Versuche wurde untersucht, ob Inositol-C2-PAF - ähnlich wie bei STAT3 - die Aktivierung von AKT durch Phosphorylierung an Ser473 beeinflusst. Dabei wurde zunächst beobachtet, was nach einer kurzzeitigen Stimulation mit Inositol-C2-PAF geschieht.

HaCaT-Zellen wurden vor der Stimulation mit Zytokinen entweder mit oder ohne Inositol-C2-PAF-haltigem Medium für eine Stunde vorinkubiert. Im Anschluss wurden sie für 15, 30 und 60 Minuten mit wechselnden Kombinationen aus Inositol-C2-PAF und IL-6, OSM oder EGF inkubiert. Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen pAKT^{Ser473} und AKT wurden durchgeführt. Die optische Dichte wurde quantifiziert und die Werte für pAKT^{Ser473} auf AKT normalisiert.

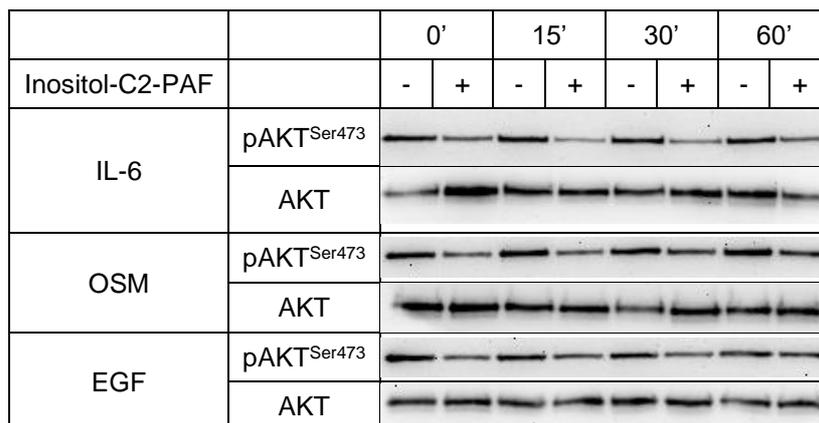
Durch die Inkubation mit Inositol-C2-PAF zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine reduzierte Phosphorylierung von AKT an Ser473.

Zur statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse nach der Stimulation mit IL-6 über 30 Minuten untersucht. Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Vergleichsgruppe normalisiert und mittels des Einstichproben-t-Tests analysiert.

Beim Mittelwertvergleich von der Kontrolle zur Stimulation mit IL-6 zeigte sich nach 30 Minuten in insgesamt vier Versuchen eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung von AKT an Ser473 ($p = 0,037$; Mittelwertunterschied von 1 zu 1,44; Abbildung 23).

Beim Mittelwertvergleich von der alleinigen Stimulation mit IL-6 zur kombinierten Stimulation mit IL-6 und Inositol-C2-PAF zeigte sich nach 30 Minuten in insgesamt vier Versuchen eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung ($p = 0,01$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,43; Abbildung 23).

(A)



(B) pAKT^{Ser473} nach 30 Minuten

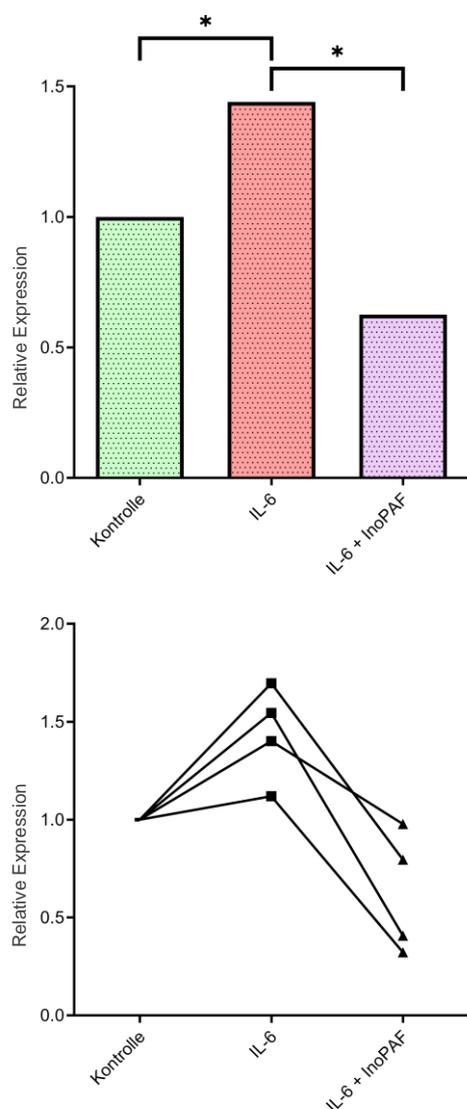


Abbildung 23: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf pAKT^{Ser473} auf Proteinebene nach Kurzzeitstimulation.

HaCaT-Zellen wurden vor der Stimulation mit Zytokinen entweder mit oder ohne Inositol-C2-PAF (InoPAF)-haltigem Medium für eine Stunde vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 Minuten mit oder ohne Interleukin-6 (IL-6), Oncostatin M (OSM) oder Epithelial Growth Factor (EGF) und Inositol-C2-PAF inkubiert. Ein Immunoblot mit Antikörpern gegen pAKT^{Ser473} und AKT wurde durchgeführt.

(A) Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot aus n = 4 für die Stimulation mit IL-6 und n = 2 jeweils für die Stimulationen mit OSM und EGF.

(B) Untersucht wurden die Ergebnisse der Stimulation mit IL-6 für 30 Minuten. Die optische Dichte wurde quantifiziert und die Werte für pAKT^{Ser473} auf AKT normalisiert. Im Anschluss wurden die Werte auf die Kontrolle normalisiert und mit Hilfe des Einstichproben-t-Test analysiert. Abgebildet sind die Mittelwerte aus vier Versuchen. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (* = p < 0,05). Unterhalb abgebildet sind die einzelnen Ergebnisse normalisiert auf die Kontrolle. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

3.5.3 Der Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT an Ser473 nach Langzeitstimulation

Ergebnisse dieses Versuchs wurden veröffentlicht in: Pelz, C., et al., Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells. *Cell Oncol (Dordr)*, 2018. 41(5): p. 505-516 [196].

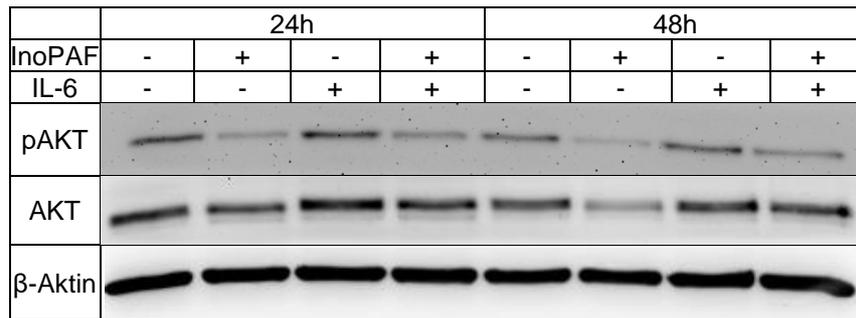
In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob Inositol-C2-PAF die Aktivierung von AKT durch Phosphorylierung an Ser473 nach einer Langzeitstimulation beeinflusst. Dazu wurden HaCaT-Zellen für 24 und 48 Stunden mit wechselnden Kombinationen aus Inositol-C2-PAF und Interleukin-6 inkubiert. Ein Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen pAKT^{Ser473} und β -Aktin wurde durchgeführt. Die optische Dichte wurde quantifiziert und die Werte für pAKT^{Ser473} auf β -Aktin und auf AKT normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurde auf die jeweilige Vergleichsgruppe normalisiert und zur Analyse der Einstichproben-t-Test verwendet.

Beim Mittelwertvergleich von der Kontrolle zur Stimulation mit Inositol-C2-PAF zeigte sich nach 24 Stunden in insgesamt vier Versuchen eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von AKT an Ser473 ($p = 0,027$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,43; Abbildung 24B). Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich nach 48 Stunden in insgesamt drei Versuchen ($p = 0,015$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,34; Abbildung 24C).

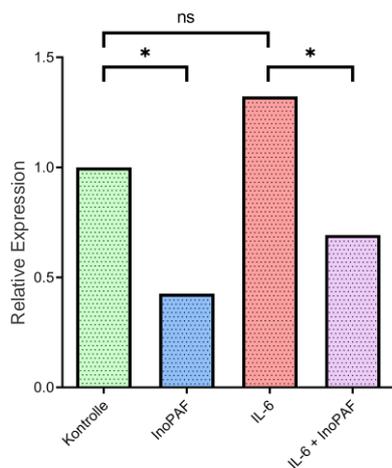
Beim Mittelwertvergleich von der Kontrolle zur Stimulation mit Interleukin-6 zeigte sich nach 24 Stunden in insgesamt vier Versuchen im t-Test bei einer Stichprobe kein signifikantes Ergebnis ($p = 0,11$; Mittelwertunterschied von 1 zu 1,3; Abbildung 24B). Auch nach einer 48-stündigen Stimulation zeigte sich kein signifikantes Ergebnis ($p = 0,47$; Mittelwertunterschied von 1 zu 1,1; Abbildung 24C).

Beim Mittelwertvergleich von der alleinigen Stimulation mit Interleukin-6 zur kombinierten Stimulation mit Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF zeigte sich nach 24 Stunden in insgesamt vier Versuchen im t-Test bei einer Stichprobe eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von AKT an Ser473 ($p = 0,02$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,51; Abbildung 24B). Auch nach 48 Stunden zeigte sich in insgesamt drei Versuchen ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,025$; Mittelwertunterschied von 1 zu 0,28; Abbildung 24C).

(A)



(B) pAKT, 24 Stunden



(C) pAKT, 48 Stunden

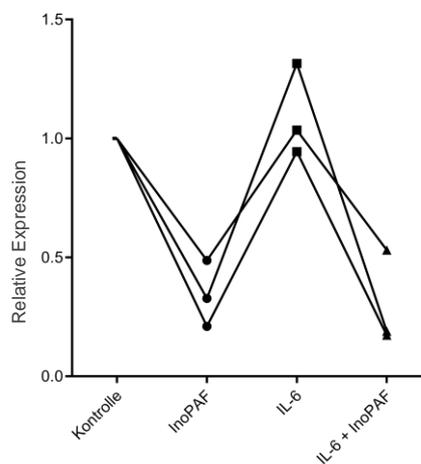
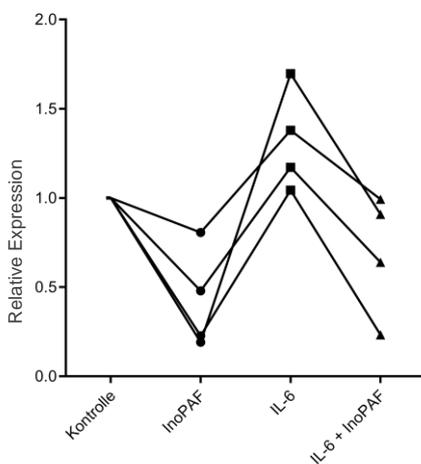
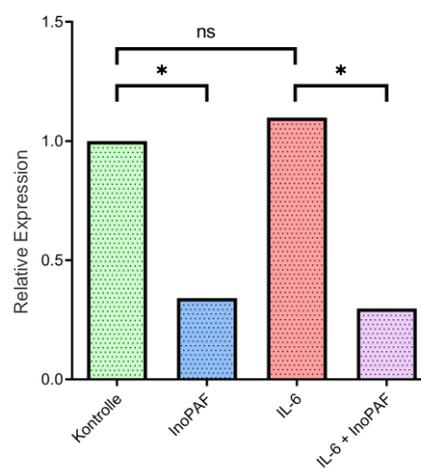


Abbildung 24: Der Einfluss von Interleukin-6 und Inositol-C2-PAF auf pAKT_{Ser473} auf Proteinebene.

HaCaT-Zellen wurden für 24 (A) und 48 (B) Stunden mit oder ohne Interleukin-6 (IL-6) und Inositol-C2-PAF (InoPAF) inkubiert. Ein Immunoblot mit Antikörpern gegen pAKT_{Ser473} und β -Aktin wurde durchgeführt. Die optische Dichte wurde quantifiziert und die Werte für pAKT_{Ser473} auf β -Aktin normalisiert. Im Anschluss wurden die Werte auf die Kontrolle normalisiert.

(A) Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot aus $n = 3$.

(B) und (C) Abgebildet sind die Mittelwerte aus vier (B) bzw. drei (C) Versuchen. Es wurde jeweils auf die Vergleichsgruppe normalisiert und die Mittelwerte mittels des Einstichproben-t-Test analysiert. Signifikante Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$). Jeweils unterhalb abgebildet sind die einzelnen Ergebnisse normalisiert auf die Kontrolle. Ergebnisse eines Versuchs sind verbunden.

4. Diskussion

4.1. Alkylphospholipide als neuartige Therapie der Psoriasis

Alkylphospholipide (APLs) sind synthetische Derivate des Lyso-Plättchen-aktivierenden Faktors (Lyso-PAF), die meist eine Substitution an der sn2-Position des Glycerolrückgrats und der apolaren Kohlenstoffkette aufweisen. APLs sind Bestandteil der Gruppe der Antitumorlipide und wurden zunächst zum Einsatz in der Tumorthherapie entwickelt. Inositol-C2-PAF, oft als Ino-C2-PAF oder InoPAF abgekürzt, ist ein Vertreter der Gruppe der APLs. Namensgebend ist die Substitution an der sn2-Position mit dem Polyalkohol Inositol, der über eine C2-Gruppe mit dem Glycerol verbunden ist. Die Synthese von Inositol-C2-PAF wurde erstmals im Jahr 2006 beschrieben [190]. Bereits in der Erstbeschreibung wurde erkannt, dass der Wirkstoff in Keratinozyten in nicht-toxischer Konzentration die Proliferation inhibiert und gleichzeitig die Differenzierung induziert, sichtbar unter anderem durch eine Aktivierung der Differenzierungskennzeichen Involucrin und Transglutaminase [190]. Während Inositol-C2-PAF wie die meisten APLs mit dem Fokus auf seine anti-tumorigenen Eigenschaften für den potentiellen Einsatz in der Krebstherapie untersucht wurde, zeigten Mikroarraystudien auch, dass Inositol-C2-PAF die Expression von Genen beeinflusste, welche die angeborene und erworbene Immunantwort regulieren [194]. Im Jahr 2014 etablierten Semini et al. ein *in vitro*-Modell für epidermale Entzündung und wiesen auch hier die entzündungshemmenden Eigenschaften von Inositol-C2-PAF nach. Dabei wurde die epidermale Entzündung mit einer Stimulation von HaCaT-Zellen durch eine Kombination von Zytokinen, bestehend aus IL-1 α , IL-17, IL-22, TNF- α und OSM, simuliert. Als Kontrollzeichen der entzündlichen Veränderung innerhalb der Keratinozyten wurden die antimikrobiellen Peptide S100A7, S100A8 und S100A9 verwendet, deren Expression bei inflammatorischen Stimuli gesteigert wird und die bei der Psoriasis in Keratinozyten in erhöhter Konzentration vorliegen. Es wurde gezeigt, dass Inositol-C2-PAF die Expression von MHC Klasse I und II sowie CIITA, welches die Expression der MHC-Moleküle reguliert, sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene beeinflusst [64].

Diese Erkenntnisse in *in vitro*-Modellen wurden durch Versuche mit *in vivo*-Modellen ergänzt. Transgene K5.hTGF β 1-Mäuse und Mäuse mit einer JunB/c-Jun-Defizienz zeigen beide einen Hautphänotyp, der der Psoriasis beim Mensch ähnlich ist [59, 61]. In beiden Modellen zeigte sich unter der Therapie mit Inositol-C2-PAF eine deutliche Besserung des Phänotyps. Im Detail konnte eine Reduzierung der epidermalen Akanthose, des entzündlichen Hautinfiltrats und der gesteigerten Vaskularisierung sowie die Verbesserung in einem Punktsystem bestehend aus Erythem, Schuppung, Alopezie, Größe des betroffenen Areals und Körpergewicht erreicht werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF die Rekrutierung von Leukozyten in entzündlich verändertes Gewebe reduziert [3]. Dies bestätigte das Potential des Wirkstoffs zur Behandlung inflammatorischer Erkrankungen der Haut, wie zum Beispiel der Psoriasis.

Die Psoriasis ist eine Erkrankung, die verschiedene Organsysteme betreffen kann und zumeist mit typischen Hautläsionen einhergeht. Sie geht bei hoher Prävalenz mit einem hohen Leidensdruck für die Betroffenen, einer hohen Komorbidität sowie mit hohen Kosten einher (siehe Kapitel 1.1.2). Eine Heilung der Krankheit ist bis heute nicht möglich. Obwohl zahlreiche Behandlungsmöglichkeiten existieren (siehe Kapitel 1.1.5), ist in der Leitlinie zur Therapie der Psoriasis (Stand 2017) zu lesen, dass „die aktuelle Versorgung der Patienten [...] zu einer geringen Zufriedenheit der Patienten mit ihren Therapien“ führe. Weitere Wirkstoffe, insbesondere aus dem Bereich der Biologicals, befinden sich in der Entwicklung (siehe Kapitel 1.1.5.2). Viele dieser Wirkstoffe wurden gezielt entwickelt, um die Aktivität immunkompetenter Zellen zu hemmen. In der Pathogenese der Psoriasis interagieren eine große Anzahl an Zelltypen in der Dermis und Epidermis. Zahlreiche Publikationen beleuchten insbesondere die Rolle von dendritischen Zellen und verschiedenen Subpopulationen von T-Zellen in der Entstehung und Aufrechterhaltung psoriatischer Läsionen (siehe Kapitel 1.1.3). Bereits zu Beginn der 1990er Jahre rückten Keratinozyten nicht nur als Effektoren in der Entstehung der Psoriasis, sondern auch als Initiatoren einer pathologischen Immunreaktion in den Vordergrund [197]. An der proinflammatorischen Aktivität von Keratinozyten sind zahlreiche intrazelluläre Signalwege beteiligt. Allerdings stehen nur wenige davon in einer Schlüsselposition innerhalb der komplexen Signalkaskaden. Einer dieser Schlüsselwege ist der JAK-STAT-Signalweg. Eine Inhibition dieses Signalwegs wurde von Autoren bereits explizit für eine Therapie der Psoriasis vorgeschlagen [198].

4.2. Inositol-C2-PAF reduziert die Gesamtmenge an STAT3 in Keratinozyten

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) ist ein intrazelluläres Signalmolekül. Werden verschiedene Rezeptoren durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren aktiviert, so kommt es – vermittelt durch verschiedene Kinasen, wie zum Beispiel die Januskinasen (JAKs) – zu einer Phosphorylierung von STAT3 an der Tyrosinseitenkette an Position 705 (Tyr705). Eine Phosphorylierung von STAT3-Monomeren führt zu deren Dimerisierung und Translokation in den Zellkern (siehe Abbildung 3). Dort beeinflusst STAT3 als Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher Gene, insbesondere solcher, die an Entzündung und Immunantwort beteiligt sind [153]. In einer Vielzahl pathologischer Prozesse wurde eine abnormale Aktivität von STAT3 beobachtet. Auch in der Pathogenese der Psoriasis spielt es auf mehreren Ebenen eine wichtige Rolle [60, 158, 161]. Als logische Konsequenz wurden bereits erste Inhibitoren des STAT3-Signalwegs als potentielle Therapie für Psoriasis getestet [199, 200].

Die spontane Pathogenese der Psoriasis ist auf Menschen beschränkt. Um ein proinflammatorisches Milieu der Haut zu simulieren, wurden in der vorliegenden Arbeit in einem *in vitro*-Modell HaCaT-Zellen (siehe Kapitel 1.1.4) mit Zytokinen inkubiert. Anhand mehrerer Publikationen wurde ein 7-Schritt-Modell der Aufrechterhaltung der Entzündung in epidermalen Läsionen erstellt (siehe Kapitel 1.1.3). In diesem Modell steht die Stimulation durch und eine positiv-selbstverstärkende Reaktion mit IL-6 im Mittelpunkt. Eine direkte Verbindung von IL-6, STAT3 und der Pathogenese von Psoriasis in Keratinozyten wird angenommen [121-124, 201]. Daher wurde für das *in vitro*-Modell der meisten Versuche in dieser Arbeit die Stimulation mit IL-6 gewählt.

In einem ersten Versuchsaufbau wurde die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf die Proteinmenge und Genexpression von STAT3 in Keratinozyten untersucht. Dazu wurden HaCaT-Zellen für 24 und 48 Stunden mit oder ohne Inositol-C2-PAF und IL-6 behandelt. Dabei zeigte sich sowohl bei der alleinigen Inkubation mit Inositol-C2-PAF als auch bei der kombinierten Inkubation mit IL-6 zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der im Western Blot bestimmten intrazellulären Proteinmenge

an STAT3 und der mittels qRT-PCR gemessenen mRNA-Menge von STAT3 auf ca. 60 – 70%.

In den Jahren 2011 und 2014 publizierten Semini et al. Stimulationsversuche mit einem Zytokinmix (IL-1a, IL-17, IL-22, TNF- α und OSM) und Inositol-C2-PAF in HaCaT-Zellen [64, 194]. Eine Auswertung der Primärdaten der Microarrays ergab für die Wirkung des Alkylphospholipids vergleichbare Ergebnisse. In einer weiteren Publikation zeigte die Forschungsgruppe, dass Inositol-C2-PAF bei HaCaT- und Plattenepithelkarzinom-Zellen die Anheftung an die Extrazellulärmatrix verstärkt und die Motilität der Zellen reduziert [193], wobei diese Effekte mit einer Inhibition des FAK/Src-Signalwegs erklärt wurden. Auch wenn die Interaktionen zwischen dem FAK- und dem STAT3-Signalweg für Keratinozyten noch nicht abschließend aufgeklärt sind, gibt es für andere Zelltypen deutliche Hinweise auf Überschneidungen. Zum Beispiel wurde in Ovarialkarzinomzellen durch Immunpräzipitation eine Komplexbildung aus STAT3 und FAK nachgewiesen [202].

2016 publizierten Palombo et al. eine Studie zur Wirksamkeit des Flavons Luteolin-7-Glucosid als potentieller Inhibitor des STAT3-Signalwegs in Keratinozyten [200]. Obwohl dies nicht im Fokus der Publikation steht, ist aus den gezeigten Abbildungen doch klar ersichtlich, dass bei den durchgeführten Experimenten die Stimulation mit IL-6 ebenfalls zu einer Steigerung der Expression von STAT3 führt. Luteolin-7-Glucosid beeinflusst die Translokation von STAT3 in den Zellkern und wirkt dieser Expressionssteigerung – ähnlich wie Inositol-C2-PAF – entgegen. In der Publikation konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Flavon eine Akanthose reduzieren und die Expression von epidermalen Differenzierungsmarkern fördern kann – ebenjene Eigenschaften, die in vorherigen Publikationen für Inositol-C2-PAF bewiesen wurden [3, 190].

4.3. Inositol-C2-PAF reduziert die Phosphorylierung von STAT3

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF die Gesamtmenge an STAT3 in Keratinozyten reduziert. Wird STAT3 an der Tyrosinseitenkette in Position 705 phosphoryliert, führt dies zu einer Aktivierung. Das Protein dimerisiert in phosphorylierter Form, wird nachgeschaltet in den Zellkern transloziert und beeinflusst dort die Genexpression. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Auswirkungen von Inositol-C2-PAF auf die Aktivierung von STAT3 untersucht.

Vorversuche zeigten, dass Effekte von Inositol-C2-PAF in HaCaT-Zellen erst nach einer Inkubationszeit von ca. 60 Minuten auftraten. In Untersuchungen zur Dynamik des IL-6-STAT3-Signalwegs konnte gezeigt werden, dass die stärkste Aktivierung von STAT3 infolge eines IL-6-Signals in dendritischen Zellen nach ca. 20 Minuten erfolgt [203].

Daher wurden für die nächsten Versuche HaCaT-Zellen für eine Stunde mit oder ohne Inositol-C2-PAF vorinkubiert und anschließend für 15, 30 und 60 Minuten mit oder ohne Inositol-C2-PAF und IL-6 behandelt. Mittels Western Blot wurde das Signal von pSTAT3^{Tyr705} mit dem Signal von STAT3 ins Verhältnis gesetzt. Nach der Inkubation mit Interleukin-6 zeigte sich nach 30 Minuten ein signifikanter Anstieg der Aktivierung von STAT3 um ca. das 90-fache. Diese Aktivierung konnte durch Ko-Inkubation mit Inositol-C2-PAF signifikant auf ca. ein Fünftel reduziert werden.

Es wurde gezeigt, dass die Konzentration von IL-6 in menschlichem Serum bei einer Inkubationstemperatur von 40°C erst nach 21 Tagen abfiel [204]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass IL-6 gegen spontane Degradierung resistent ist. Um eine langfristige Stimulation mit dem Zytokin zu simulieren, wurden dem Medium in einem weiteren Versuchsaufbau Kombinationen aus IL-6 mit oder ohne Inositol-C2-PAF hinzugegeben. Nach 24 und 48 Stunden wurde mittels Western Blot die resultierende Phosphorylierung von STAT3 quantifiziert und auf die Gesamtmenge von STAT3 normalisiert. Die Ergebnisse zu beiden Zeitpunkten zeigten im Mittelwert eine auffällige Ähnlichkeit in allen Bedingungen, was für die Etablierung eines stabilen Zustands spricht. Es konnte mit hoher Signifikanz gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF die Phosphorylierung von STAT3 über 24 und 48 Stunden hinweg auf ca. 25% des Kontrollniveaus reduziert. Ebenfalls zu beiden Zeitpunkten zeigte sich durch die

Stimulation mit IL-6 allein eine signifikante Erhöhung der Phosphorylierung auf das ca. 3,8-fache des Ursprungswerts. Erfolgte eine kombinierte Inkubation mit IL-6 und Inositol-C2-PAF, so wurde die Aktivierung von STAT3 deutlich und signifikant inhibiert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde eine langfristige Stimulation von Keratinozyten durch zahlreiche weitere Zytokine simuliert. Unter anderem wurden OSM und EGF verwendet, denen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Psoriasis zugeschrieben wird. Zudem wurden auch Stimulationsversuche mit TNF- α , IL-17 und IL-22 durchgeführt, diese Versuche wurden in der vorliegenden Arbeit zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Während die Zytokine eine unterschiedlich starke Phosphorylierung von STAT3 auslösten, zeigte sich durch die Co-Inkubation mit Inositol-C2-PAF stets eine deutlich reduzierte Aktivierung von STAT3.

Es lässt sich schlussfolgern, dass Inositol-C2-PAF die Aktivierung von STAT3 sowohl unter Ruhebedingungen als auch nach einer kurz- und langfristigen Stimulation deutlich reduziert. Bei diesen Versuchen wurde die Phosphorylierung von STAT3 immer ins Verhältnis zur gesamten STAT3-Proteinmenge gesetzt. Da Inositol-C2-PAF zusätzlich die STAT3-Expression auf Transkript- und Proteinebene reduziert, kann das Phospholipid als potenter Inhibitor des STAT3-Signalwegs in Keratinozyten angesehen werden.

4.4. Inositol-C2-PAF reduziert die nukleäre Lokalisation von STAT3

Wird STAT3 durch Phosphorylierung an der Tyrosinseitenkette 705 aktiviert, so bilden sich Homodimere, welche wiederum in den Zellkern transferiert werden, wo STAT3 seine genregulatorische Funktion ausübt.

Darüber hinaus existieren Vorstellungen, die von diesem kanonischen Modell abweichen. So wird zum Beispiel untersucht, ob eine Dimerisierung von STAT-Molekülen eine notwendige Bedingung für die Signaltransduktion ist. In menschlichen HepG2-Zellen und A375-Zellen wurden prä-assozierte STAT1/STAT3-Dimere unabhängig von einer Stimulation mit IL-6 gefunden. Derartig präformierte Dimere wurden ausschließlich im Zytoplasma und nicht im Zellkern nachgewiesen [205-207]. Eine Dimerisierung von STAT3 wurde auch in nicht-phosphorylierten STATs beobachtet [208-210]. Allerdings scheint eine Phosphorylierung notwendig zu sein, damit STAT3 an spezifische DNA-Abschnitte binden kann [144]. Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass STAT3 in einem nicht-phosphorylierten Zustand latent im Zellkern vorhanden ist und möglicherweise auch in dieser Form an der Regulation der Genexpression beteiligt ist [208, 211, 212]. Eine Zusammenfassung zahlreicher nicht-kanonischer Modelle der Funktionsweise von STAT3 wurde 2012 von Mohr et al. publiziert [103].

Infolge dieser verschiedenen Modelle erschien es notwendig, den Beweis zu führen, dass Inositol-C2-PAF nicht nur die Phosphorylierung von STAT3 reduziert, sondern auch, dass es die nukleäre Lokalisation von STAT3 sowie dessen Genregulation inhibiert.

Daher wurden in einem weiteren Versuchsaufbau HaCaT-Zellen über eine Stunde mit oder ohne Inositol-C2-PAF vorinkubiert und anschließend für 15 Minuten mit oder ohne OSM und mit oder ohne Inositol-C2-PAF inkubiert. Anschließend wurden STAT3 und pSTAT3^{Tyr705} mit spezifischen Immunfluoreszenzantikörpern markiert.

Während im Ruhezustand STAT3 und pSTAT3^{Tyr705} gleichmäßig über das Zytosol verteilt waren, zeigte sich nach Stimulation OSM eine deutlich konzentrierte nukleäre Lokalisation. Durch Co-Inkubation mit OSM und Inositol-C2-PAF wurde die nukleäre Lokalisation deutlich reduziert.

K5.STAT3C-transgene Mäuse exprimieren in ihren Keratinozyten eine dauerhaft aktive Form von STAT3 und zeigen einen Phänotyp mit Hautläsionen, die denen der menschlichen Psoriasis ähnlich sind. 2010 publizierten Miyoshi et al. eine Studie, in der

diese Mäuse mit STA-21, einem Inhibitor des STAT3-Signalwegs, behandelt wurden [199]. Durch sogenanntes „tape stripping“, also der mechanischen Reizung der Haut, wurde die nukleäre Lokalisation von STAT3 in Keratinozyten der Tiere erhöht. Eine Vorbehandlung mit STA-21 reduzierte die nukleäre Lokalisation von STAT3. In dieser Publikation wurden außerdem Experimente mit Normal Human Keratinocytes (NHK-Zellen) gezeigt. Die Zellen wurden für eine Stunde mit oder ohne STA-21 vorinkubiert und danach für 30 Minuten mit EGF, IL-6 oder IL-22 stimuliert. Nach Inkubation mit den Zytokinen zeigte sich eine deutliche nukleäre Lokalisation von STAT3. Durch eine Behandlung mit STA-21 wurde die nukleäre Lokalisation inhibiert.

Um die Wirkung von Inositol-C2-PAF mit STA-21 zu vergleichen, erfolgte in einem weiteren Versuchsaufbau die Stimulation der HaCaT-Zellen mit OSM und Inositol-C2-PAF sowie mit STA-21. In diesem Versuch zeigte sich erneut eine deutliche nukleäre Lokalisation von STAT3 nach Stimulation mit OSM. Sowohl STA-21 als auch Inositol-C2-PAF verhinderten diesen Effekt. Dabei zeigte sich unter Behandlung mit STA-21 eine gleichmäßige Verteilung von STAT3 in Zytosol und Nukleus, während nach Behandlung mit Inositol-C2-PAF die Zellkerne kaum Signale für STAT3 zeigten. Dies lässt vermuten, dass Inositol-C2-PAF bei gleicher Konzentration eventuell ein potenterer Inhibitor der nukleären Lokalisation von STAT3 als STA-21 sein könnte.

Obwohl die beiden Versuche zur Translokation des STAT3-Dimers jeweils nur einmal durchgeführt wurden und somit keine statistische Auswertung möglich war, stützen die erhaltenen Daten der indirekten Fluoreszenz-Analyse die zuvor dargestellten Ergebnisse zum Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Aktivierung von STAT3.

4.5. Inositol-C2-PAF reduziert die Expression STAT3-abhängiger Gene

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Inositol-C2-PAF die intrazelluläre Menge, die Aktivierung durch Phosphorylierung sowie die nukleäre Lokalisation von STAT3 reduziert. Um in einem letzten Schritt die Auswirkungen genregulatorischer Funktionen von STAT3 zu untersuchen, wurde die Expression STAT3-abhängiger Gene mittels qRT-PCR bestimmt.

4.5.1. BIRC5 / Survivin

Es wurde gezeigt, dass STAT3 die Genexpression von BIRC5 in HaCaT-Zellen beeinflusst [213]. BIRC5 ist ein Regulator der Mitose und ein Inhibitor des apoptotischen und nicht-apoptotischen Zelltods [214]. Von manchen Autoren wird die synonyme Bezeichnung Survivin explizit für das Genprodukt verwendet. Es ist in gesundem Gewebe erwachsener Menschen kaum nachweisbar, zeigt jedoch in einem Großteil der Tumore eine erhöhte Expression [215]. Es wurde vermutet, dass Survivin in der Haut eine kontinuierliche niedrige Aktivität aufweist, um das regenerative Potential von epidermalen Stammzellen zu bewahren und die Epidermis so vor den Folgen von Umwelteinflüssen, wie zum Beispiel UV-Licht, zu beschützen [216]. In psoriatischen Hautläsionen konnte BIRC5 in erhöhter Konzentration in der Basalzellschicht der Epidermis und in Endothelzellen nachgewiesen werden [217]. Bei von Psoriasis Betroffenen korrelierte die Expression von Survivin mit der Krankheitsaktivität und konnte durch Therapie mit Infliximab inhibiert werden [218]. Dies sind Hinweise darauf, dass BIRC5 eine wichtige Funktion in der Pathogenese der Psoriasis spielt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF die basale Expressionsrate unstimulierter HaCaT-Zellen nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden um ca. 70% und nach 48 Stunden sogar um ca. 90% reduzieren kann. Eine Stimulation der Expression von BIRC5 allein durch IL-6 konnte nicht nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass erst das kombinierte Zytokinmilieu, wie es in psoriatischen Läsionen vorliegt, die Expression eines so wichtigen intrazellulären Regulators wie Survivin beeinflussen kann. Bei der diesbezüglichen Auswertung der Primärdaten von Semini et al. [64, 194] zeigte sich eine Differenz in den beobachteten Signalen der

Kontrollgruppen, sodass hier eine klare Interpretation der Ergebnisse nicht möglich war. Die erkennbaren Tendenzen ließen jedoch eine Stimulation der Expression von BIRC5 durch den Zytokinmix sowie eine inhibitorische Wirkung von Inositol-C2-PAF vermuten.

4.5.2. S100A7

Die Expression von S100A7 wird in Keratinozyten vermutlich durch STAT3 reguliert [219, 220]. S100A7 wurde erstmalig bei der Untersuchung von Keratinozyten aus psoriatischen Hautläsionen entdeckt und dementsprechend Psoriasin genannt [221]. S100A7 wird in psoriatischen Hautläsionen in erhöhter Konzentration exprimiert. Nach seiner Sekretion aus Keratinozyten bewirkt es durch Chemotaxis die Rekrutierung von CD4⁺-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten [222, 223]. In neutrophilen Granulozyten löst Psoriasin darüber hinaus die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 aus [224]. Es wurde angenommen, dass S100A7 über die Bindung an RAGE-Rezeptoren (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) wiederum den STAT3-Signalweg und die Produktion von IL-6 stimulieren kann [225]. Psoriasin könnte somit an einem positiv-selbstverstärkenden Kreislauf und in der Folge an der Aufrechterhaltung eines proinflammatorischen Zytokinmilieus beteiligt sein [226].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF die basale Expressionsrate von S100A7 in HaCaT-Zellen signifikant reduziert. Die Versuche zur Stimulation mit Zytokinen ließen darauf schließen, dass IL-6 in Keratinozyten die Expression von S100A7 stimuliert. Obwohl alle drei Wiederholungen des Versuchs die gleiche Tendenz, nämlich eine Stimulation der S100A7-Genexpression durch IL-6, zeigten, wiesen sie doch im Ausmaß der Stimulation eine große Bandbreite auf, sodass die Ergebnisse in der statistischen Auswertung keine Signifikanz aufwiesen. Es kann jedoch bei einer größeren Versuchszahl ein signifikantes Ergebnis vermutet werden. Ebenso zeigten alle Versuche eine Inhibition der Genexpression von S100A7 durch die gleichzeitige Inkubation mit Inositol-C2-PAF. Auch hier schwankten die Ergebnisse im Ausmaß der Inhibition, sodass das Ergebnis nicht signifikant war.

Inositol-C2-PAF könnte über eine Inhibition der Genexpression von S100A7 in psoriatischen Läsionen nicht nur einen auto- und parakrinen selbstverstärkenden proinflammatorischen Kreislauf unterbrechen, sondern eventuell auch zu einer Reduktion der Rekrutierung von Immunzellen führen.

4.5.3. Cyclin D1

Cyclin D1 beeinflusst den Zellzyklus und die Zellproliferation. In psoriatischen Hautläsionen kann eine erhöhte Expression von Cyclin D1 festgestellt werden [227]. Diese kann durch eine Phototherapie reduziert werden [228]. Auch der Inhibitor des STAT3-Signalwegs STA-21 inhibiert in NHK-Zellen die Expression von Cyclin D1 [199]. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass Inositol-C2-PAF die CCND1-Genexpression hemmt. In der Pathogenese der Psoriasis kommt es zur übermäßigen Proliferation von Keratinozyten und als Resultat zur typischen silbrigen Schuppung der Haut. In diesen Prozess könnte Inositol-C2-PAF durch die Hemmung der Expression von Cyclin D1 eingreifen.

4.5.4. Interleukin-6

IL-6 ist entscheidend an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt (siehe Kapitel 1.1.3). STAT3 spielt bei der Signaltransduktion von IL-6 eine wichtige Rolle [121]. Da STAT3 wiederum an den Promotor der Gensequenz von IL-6 bindet und dessen Expression stimuliert [229], kann IL-6 einen autokrinen und parakrinen Kreislauf der positiven Selbstverstärkung hervorrufen. Wird vermehrt IL-6 durch Keratinozyten produziert, werden zudem die Immunzellen in der Epidermis und Dermis beeinflusst. IL-6 unterdrückt die physiologische Funktion von regulatorischen T-Zellen [37]. Dadurch wiederum wird die Suppression von Th17- und Th1-Zellen gehemmt [40]. Zeigen Th1-Zellen eine ungehemmte Aktivität, stimulieren sie dendritische Zellen [25], die wiederum unter anderem IL-6 freisetzen und gleichzeitig, zum Beispiel über die Ausschüttung von IL-1, Th17-Zellen aktivieren [25, 43]. Aktive Th17-Zellen produzieren unter anderem die proinflammatorischen Zytokine IL-17 und -22, welche in Keratinozyten die Expression von IL-6 fördern – der proinflammatorische Kreislauf schließt sich [44-46]. Dieser Kreislauf ist in Abbildung 25 illustriert. Solche selbstverstärkenden proinflammatorischen Prozesse wurden auch bei anderen Gewebe- und Zelltypen, wie z.B. bei PBMCs [39], beobachtet und wurde bereits von anderen Autoren als relevant für die Pathogenese der Psoriasis beschrieben [39, 230].

Bekannte und wirksame Therapien der Psoriasis durch Biologicals, zum Beispiel Adalimumab, Etanercept, Infliximab und Ustekinumab, die alle zwar nicht explizit STAT3 oder das IL-6-Signal beeinflussen, führten dennoch zu einer reduzierten Serumkonzentration von IL-6, was die Rolle des Zytokins im Wechselspiel der Signalwege bei der Pathogenese der Psoriasis unterstreicht [231].

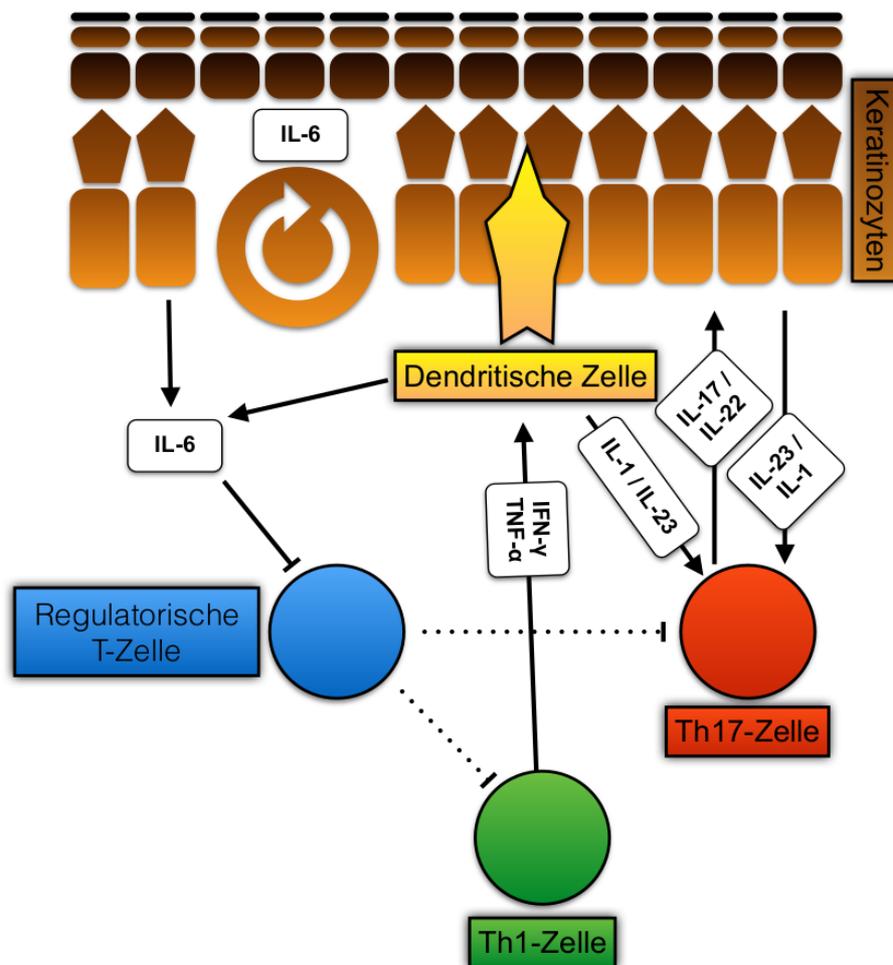


Abbildung 25: Der positiv-selbstverstärkende proinflammatorische Kreislauf der auto- und parakrinen Sekretion von Interleukin-6 in psoriatischen Hautläsionen.

Schematisch dargestellt sind die Vorgänge in Epidermis und Dermis in psoriatischen Läsionen. Interleukin-6 (IL-6) supprimiert die Aktivität von regulatorischen T-Zellen, sodass Th1- und Th17-Zellen eine unbehinderte Aktivität zeigen. Th1-Zellen aktivieren dendritische Zellen, welche wiederum IL-6, -1 und -23 produzieren. IL-1 und -23 aktivieren Th17-Zellen und diese stimulieren Keratinozyten zur Freisetzung von IL-6.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF die Expression von IL-6 in HaCaT-Zellen signifikant inhibiert. Bei einer Auswertung der Primärdaten von Semini et al. zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Nach der Analyse von Daten, die von der Arbeitsgruppe Danker der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt wurden, zeigte sich, dass die Stimulation von HaCaT-Zellen mit einer Kombination aus Zytokinen (IL-1 α , IL-17, IL-22, TNF- α und OSM) zur gesteigerten Expression von IL-6 führt und eine gleichzeitige Inkubation mit Inositol-C2-PAF diese Expression deutlich reduzieren kann. Diese Zusammenhänge konnten durch die Auswertung der Rohdaten von Semini et al. [64, 194] bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser *in vitro*-Versuche werden durch die *in vivo*-Versuche von Forkel et al. [3] komplementiert. Dabei wurden transgene Mäuse verwendet, die eine latente Expression von menschlichem transformierendem Wachstumsfaktor β 1 (hTGF- β 1) aufweisen. Sowohl makro- als auch mikroskopisch wurde dadurch ein der Psoriasis ähnlicher Phänotyp in Dermis und Epidermis erzeugt. Wurden die transgenen Mäuse mittels intraperitonealer Injektion mit Inositol-C2-PAF behandelt, konnte dieser Phänotyp anschaulich abgemildert werden. In der Publikation führen die Autoren diesen Effekt primär auf eine antiinflammatorische Wirkung von Inositol-C2-PAF in Endothelzellen und eine Inhibition der Rekrutierung von Immunzellen zurück. Wie im Supplement der Publikation zu erkennen ist, ist die Expression von Interleukin-6 in den transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp verstärkt. Durch die Behandlung mit Inositol-C2-PAF zeigte sich auch im Mausmodell eine deutlich verminderte Expression von IL-6.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Inositol-C2-PAF als Inhibitor des STAT3-Signalwegs in Keratinozyten das Potential hat, einen pathologischen proinflammatorischen Kreislauf der auto- und parakrinen Sekretion von IL-6 zu unterbrechen. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass auch in dem beschriebenen Mausmodell die direkte Wirkung von Inositol-C2-PAF auf Keratinozyten – in Synergie mit der Wirkung auf Endothelzellen – für die Verbesserung des Phänotyps verantwortlich ist.

4.6. Inositol-C2-PAF inhibiert den Akt-Signalweg

Inositol-C2-PAF wird der Gruppe der Antitumorlipide zugeordnet. Als solches ist es naheliegend, dass auch das Potential des Wirkstoffs in der Therapie verschiedener Malignome untersucht wurde. Dabei spielt die Regulation von Proliferation und Zellmigration eine wichtige Rolle. Im Rahmen der Publikation der Arbeitsgruppe Danker (Charité - Universitätsmedizin Berlin), in die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eingeflossen sind [196], wurde auch der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Inhibition von Proliferation und Zellmigration in MCF-7-Zellen und MDA-MB-231-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF in diesen Zellen die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an der Serinseitenkette in Position 473 hemmt.

Akt wird als Kinase in die Signaltransduktion des PI3K-Akt-mTOR-Signalwegs eingeordnet. Dieser Signalweg ist entscheidend an der Regulation von Proliferation, Apoptose und Zellmigration beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Inositol-C2-PAF die Aktivierung des STAT3-Signalwegs inhibiert. Wie genau es zu dieser Inhibition kommt, bleibt allerdings weiterhin unklar. Um die Wirkweise weiter aufzuklären, wurde der Einfluss des ATL auf die Aktivierung von Akt untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF analog zu dessen Einfluss auf STAT3 nach kurz- und langfristiger Einwirkung auf HaCaT-Zellen auch die Phosphorylierung von Akt inhibiert. Zudem konnte eine Reduktion der intrazellulären Akt-Konzentration nachgewiesen werden, ebenfalls analog zu STAT3. Inositol-C2-PAF inhibiert demzufolge sowohl den STAT3- als auch den Akt-Signalweg.

Zwischen dem PI3K-Akt-mTOR-Signalweg und dem STAT3-Signalweg bestehen zahlreiche Interaktionen. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die vollständige Signaltransduktion von IL-6 in Hep3B-Zellen von der Aktivität beider Signalwege abhängig ist [232]. Auf welche Art die Signalwege gleichzeitig beeinflusst werden und sich gegenseitig regulieren ist aktuell Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Es wurde beschrieben, dass eine Aktivierung von Gp130 und JAKs nicht nur zur Aktivierung von STAT3, sondern parallel auch zur Phosphorylierung von PI3K und als Konsequenz zur Aktivierung von Akt führte [233]. Sano et al. zeigten in ihrer Publikation, dass in Keratinozyten die Funktion des STAT3-Signalwegs durch Inhibition von PI3K gestört wird [234]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass PI3K in beiden Signalwegen eine Rolle spielen könnte. Zudem scheinen beide Signalwege auch durch SOCS3 beeinflusst zu werden [235]. Neben der Regulation beider Signalkaskaden durch gleiche Moleküle gibt

es zudem Hinweise darauf, dass Akt über Transkriptionsfaktoren die Expression und Funktion von STAT3 beeinflussen [236] und über die Regulation der Serinphosphorylierung die DNA-Bindung von STAT3 regulieren kann [237].

Für weitere Studien zur Wirkweise von Inositol-C2-PAF lohnt es sich daher, die Überschneidungspunkte der beiden Signalwege in den Fokus zu nehmen.

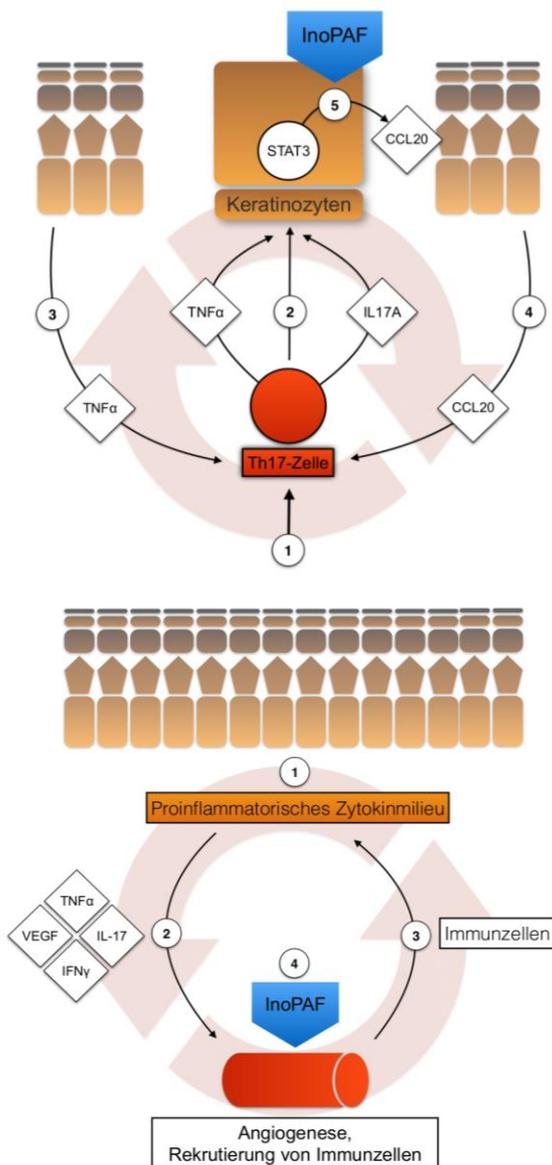
4.7. Inositol-C2-PAF unterbricht den proinflammatorischen Kreislauf

Auf Grundlage der bisherigen Forschungsergebnisse existieren verschiedene Modelle zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Psoriasis. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell vorgestellt, in dem eine Stimulation der Keratinozyten mit IL-6 im Mittelpunkt steht. Wie in Kapitel 4.5.4 beschrieben, inhibiert Inositol-C2-PAF die Genexpression von IL-6 in Keratinozyten und unterbricht damit den positiv-selbstverstärkenden proinflammatorischen Kreislauf dieses Zytokins. Weitere selbstverstärkende Kreisläufe, insbesondere unter Beteiligung von TNF- α , wurden bei der Entstehung der Psoriasis beschrieben (siehe Kapitel 1.1.3). Diese Kreisläufe beziehen sowohl die Dermis als auch die Epidermis mit ein (siehe Abbildung 26).

Ein Kreislauf mit Fokus auf die Epidermis geht von aktivierten Th17-Zellen aus. Diese sezernieren unter anderem IL-17a und TNF- α . Diese Zytokine stimulieren Keratinozyten, welche dadurch selbst vermehrt TNF- α und CCL20 exprimieren [238]. Dadurch wird wiederum die Stimulation von Th17-Zellen aufrechterhalten. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression von CCL20 in Keratinozyten durch die STAT3- und Akt-Signalwege reguliert wird [239, 240]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Inositol-C2-PAF beide Signalwege beeinflusst. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob Inositol-C2-PAF auch einen Einfluss auf die Genexpression von CCL20 hat und somit auch diesen Kreislauf unterbrechen könnte.

Ein dritter Kreislauf nimmt die Dermis in den Fokus. In psoriatischen Hautläsionen werden von zahlreichen Zelltypen, unter anderem Th1-, Th17- und dendritischen Zellen sowie Keratinozyten, eine Fülle an angiogenetischen Faktoren freigesetzt, zum Beispiel IL-17, TNF- α , IFN- γ und VEGF [241]. Neben einer gesteigerten Angiogenese stimulieren diese Faktoren auch die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen, zum Beispiel E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 [242-244]. Infolgedessen kommt es zu einer verstärkten

Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut in die psoriatischen Hautläsionen. Diese Immunzellen erhalten das inflammatorische Zytokinmilieu aufrecht und es entsteht ein proinflammatorischer Kreislauf. Inositol-C2-PAF reduzierte die Expression von Molekülen, die an der Rekrutierung von Immunzellen beteiligt sind, und hat damit das Potential, auch diesen Kreislauf zu unterbrechen [3]. Das Konzept, die Angiogenese und die Rekrutierung von Immunzellen zu inhibieren und dadurch die Entzündung in psoriatischen Läsionen zu reduzieren, wurde bereits mit einer anti-VEGF-Therapie erfolgreich getestet [245].



(A) Der positiv-selbstverstärkende Kreislauf von TNF-α in der Epidermis.

In psoriatischen Läsionen werden Th17-Zellen vermehrt aktiviert (1) und sezernieren Interleukin-17A (IL17A) und TNF-α (2). Dadurch werden Keratinozyten stimuliert und sezernieren vermehrt TNF-α (3) und CCL20 (4), welche wiederum Th17-Zellen aktivieren.

Inositol-C2-PAF (InoPAF) inhibiert STAT3. Da die Expression von CCL20 in Keratinozyten durch die STAT3- und Akt-Signalwege reguliert wird, hat Inositol-C2-PAF das Potential, den Kreislauf an dieser Stelle zu unterbrechen (5).

(B) Der positiv-selbstverstärkende Kreislauf von TNF-α in der Dermis.

In psoriatischen Hautläsionen besteht ein proinflammatorisches Zytokinmilieu (1). Eine Fülle an Faktoren, zum Beispiel IL-17, TNF-α, IFN-γ und VEGF, stimulieren die Angiogenese und die Rekrutierung von Immunzellen in die psoriatischen Läsionen (2). Diese Immunzellen erhalten das inflammatorische Zytokinmilieu aufrecht und es entsteht ein proinflammatorischer Kreislauf (3). Inositol-C2-PAF reduziert unter anderem die Expression von VCAM-1, E-Selektin und ICAM-1 in Endothelzellen sowie die Expression von Zelladhäsionsmolekülen in PBMCs. Damit hat Inositol-C2-PAF das Potential, diesen Kreislauf zu unterbrechen (4).

Abbildung 26: Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf proinflammatorische Kreisläufe in Dermis und Epidermis.

In der Pathogenese der Psoriasis existieren verschiedene proinflammatorische Kreisläufe. Inositol-C2-PAF hat das Potential, diese Kreisläufe auf Ebene der Epidermis (A) und der Dermis (B) zu inhibieren.

4.8. Das Potential von Inositol-C2-PAF

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Inositol-C2-PAF in Keratinozyten den STAT3-Signalweg durch Inhibition der Genexpression, der kurz- und langfristigen Phosphorylierung, und der nukleären Lokalisation von STAT3 sowie der Expression von STAT3-abhängigen und für die Pathogenese der Psoriasis relevanten Gene hemmt. Eine Inhibition von STAT3 in Keratinozyten wurde bereits als Therapie der Psoriasis beschrieben [60] und Inhibitoren des STAT3-Signalwegs, wie zum Beispiel STA-21, werden in klinischen Studien getestet [199]. Die entzündungshemmenden Eigenschaften von Inositol-C2-PAF beschränken sich allerdings nicht nur auf Keratinozyten. Es konnte gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF auch in menschlichen Gefäßendothelzellen die Apoptose induzieren konnte, falls diese zuvor mit TNF- α stimuliert wurden. Auf nicht-stimulierte Zellen hatte das APL dabei keinen Einfluss. Zudem wurde die Genexpression von Adhäsionsmolekülen, die an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt sind, durch Inositol-C2-PAF reduziert [3].

Mit dem hier gezeigten Potential von Inositol-C2-PAF, einer Entzündungsreaktion in Keratinozyten und Endothelzellen entgegenzuwirken, qualifiziert sich das APL für weitere Studien und sollte in Bezug auf eine klinische Anwendung getestet werden.

Während in mehreren Publikationen das Potential von Inositol-C2-PAF bei der Tumorthherapie im Vordergrund stand, unterstreicht die vorliegende Arbeit das antiinflammatorische Potential des APL. Inflammation und Tumorwachstum sind dabei keine voneinander unabhängige Prozesse, sondern können sich gegenseitig bedingen und verstärken [153]. So begünstigt ein proinflammatorisches Zytokinmilieu die Entstehung und das Wachstum von malignen Neoplasien [246]. Zum Beispiel konnte für die Entstehung eines Kolonkarzinoms ein Zusammenhang mit chronischer Entzündung gezeigt werden [247]. Ein solcher Zusammenhang wird ebenfalls in der Entstehung von malignen Neoplasien der Haut angenommen [248].

Der STAT3-Signalweg, welcher durch Inositol-C2-PAF in Keratinozyten inhibiert wird, ist in einer Vielzahl von Neoplasien übermäßig aktiviert, sodass die hier gezeigte Inhibition dieses Signalwegs auch in der Therapie von Malignomen eingesetzt werden könnte. Die vorliegende Arbeit demonstriert das Potential von Inositol-C2-PAF, eine IL-6-vermittelte Aktivierung von STAT3 und in der Folge eine positiv-selbstverstärkende

proinflammatorische Reaktion zu unterbinden. Eine solche Unterbrechung von positiv-selbstverstärkenden Reaktionen durch eine Inhibition der Signalachse über IL-6 und STAT3 wurde auch als potentielle Therapie von Tumorwachstum und -metastasierung beschrieben [249].

Die hier gezeigten Ergebnisse unterstreichen also nicht nur das Potential von Inositol-C2-PAF in der Behandlung der Psoriasis. Auch für eine Anwendung in der Tumorthherapie zeigt sich das APL vielversprechend.

Literaturverzeichnis

1. Lowes, M.A., M. Suarez-Farinas, and J.G. Krueger, *Immunology of psoriasis*. *Annu Rev Immunol*, 2014. **32**: p. 227-55.
2. Abramowski, P., K. Steinbach, A.R. Zander, and R. Martin, *Immunomodulatory effects of the ether phospholipid edelfosine in experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neuroimmunol*, 2014. **274**(1-2): p. 111-24.
3. Forkel, S., M. Schon, A. Hildmann, A. Classen, S.M. John, K. Danker, and M.P. Schon, *Inositolated Platelet-Activating Factor (Ino-C2-PAF) Modulates Dynamic Lymphocyte-Endothelial Cell Interactions and Alleviates Psoriasis-Like Skin Inflammation in Two Complementary Mouse Models*. *J Invest Dermatol*, 2014.
4. Lowes, M.A., A.M. Bowcock, and J.G. Krueger, *Pathogenesis and therapy of psoriasis*. *Nature*, 2007. **445**(7130): p. 866-73.
5. Griffiths, C.E. and J.N. Barker, *Pathogenesis and clinical features of psoriasis*. *Lancet*, 2007. **370**(9583): p. 263-71.
6. Menter, A. and J.N. Barker, *Psoriasis in practice*. *Lancet*, 1991. **338**(8761): p. 231-4.
7. Schafer, I., S.J. Rustenbach, M. Radtke, J. Augustin, G. Glaeske, and M. Augustin, *[Epidemiology of psoriasis in Germany--analysis of secondary health insurance data]*. *Gesundheitswesen*, 2011. **73**(5): p. 308-13.
8. Augustin, M., K. Reich, G. Glaeske, I. Schaefer, and M. Radtke, *Co-morbidity and age-related prevalence of psoriasis: Analysis of health insurance data in Germany*. *Acta Derm Venereol*, 2010. **90**(2): p. 147-51.
9. Danielsen, K., A.O. Olsen, T. Wilsgaard, and A.S. Furberg, *Is the prevalence of psoriasis increasing? A 30-year follow-up of a population-based cohort*. *Br J Dermatol*, 2013. **168**(6): p. 1303-10.
10. Parisi, R., D.P. Symmons, C.E. Griffiths, and D.M. Ashcroft, *Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(2): p. 377-85.

11. Anstey, A., H. McAteer, N. Kamath, and F. Percival, *Extending psychosocial assessment of patients with psoriasis in the UK, using a self-rated, web-based survey*. Clin Exp Dermatol, 2012. **37**(7): p. 735-40.
12. Sander, H.M., L.F. Morris, C.M. Phillips, P.E. Harrison, and A. Menter, *The annual cost of psoriasis*. J Am Acad Dermatol, 1993. **28**(3): p. 422-5.
13. Finlay, A.Y. and E.C. Coles, *The effect of severe psoriasis on the quality of life of 369 patients*. Br J Dermatol, 1995. **132**(2): p. 236-44.
14. Jungen, D., M. Augustin, A. Langenbruch, N. Zander, K. Reich, K. Stromer, D. Thaci, S. Purwins, M. Radtke, and M. Gutknecht, *Cost-of-illness of psoriasis - results of a German cross-sectional study*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2018. **32**(1): p. 174-180.
15. Bickers, D.R., H.W. Lim, D. Margolis, M.A. Weinstock, C. Goodman, E. Faulkner, C. Gould, E. Gemmen, T. Dall, A. American Academy of Dermatology, and D. Society for Investigative, *The burden of skin diseases: 2004 a joint project of the American Academy of Dermatology Association and the Society for Investigative Dermatology*. J Am Acad Dermatol, 2006. **55**(3): p. 490-500.
16. Scarpa, R., *New insights into the concept of psoriatic disease*. J Rheumatol Suppl, 2012. **89**: p. 4-6.
17. Scarpa, R., F. Ayala, N. Caporaso, and I. Olivieri, *Psoriasis, psoriatic arthritis, or psoriatic disease?* J Rheumatol, 2006. **33**(2): p. 210-2.
18. Brandrup, F., M. Hauge, K. Henningsen, and B. Eriksen, *Psoriasis in an unselected series of twins*. Arch Dermatol, 1978. **114**(6): p. 874-8.
19. Bhalerao, J. and A.M. Bowcock, *The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(10): p. 1537-45.
20. Kimberling, W. and R.L. Dobson, *The inheritance of psoriasis*. J Invest Dermatol, 1973. **60**(6): p. 538-40.
21. Kuner, N., W. Hartschuh, and B. Khan-Durani, *[Heinrich Kobner and the "isomorphic phenomenon". History and review of the literature]*. Hautarzt, 2003. **54**(3): p. 274-8.
22. Rongioletti, F., C. Fiorucci, and A. Parodi, *Psoriasis induced or aggravated by drugs*. J Rheumatol Suppl, 2009. **83**: p. 59-61.
23. Lande, R., E. Botti, C. Jandus, D. Dojcinovic, G. Fanelli, C. Conrad, G. Chamilos, L. Feldmeyer, B. Marinari, S. Chon, L. Vence, V. Ricciari, P. Guillaume, A.A. Navarini, P. Romero, A. Costanzo, E. Piccolella, M. Gilliet, and L. Frasca, *The*

- antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5621.
24. Calautti, E., L. Avalle, and V. Poli, *Psoriasis: A STAT3-Centric View*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
25. Kryczek, I., A.T. Bruce, J.E. Gudjonsson, A. Johnston, A. Aphale, L. Vatan, W. Szeliga, Y. Wang, Y. Liu, T.H. Welling, J.T. Elder, and W. Zou, *Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4733-41.
26. Hirota, K., M. Hashimoto, H. Yoshitomi, S. Tanaka, T. Nomura, T. Yamaguchi, Y. Iwakura, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi, *T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 41-7.
27. Ettehadi, P., M.W. Greaves, D. Wallach, D. Aderka, and R.D. Camp, *Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions*. Clin Exp Immunol, 1994. **96**(1): p. 146-51.
28. Seishima, M., M. Seishima, M. Takemura, K. Saito, and Y. Kitajima, *Increased serum soluble Fas, tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 concentrations in generalized pustular psoriasis*. Dermatology, 1998. **196**(3): p. 371-2.
29. Cordiali-Fei, P., M. Ardigo, A. Mastroianni, A. Giuliani, D.A. G, V. Bordignon, E. Trento, A. Vento, and E. Berardesca, *Serum cytokines and bioumoral immunological characterization of psoriatic patients in long term etanercept treatment*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2008. **21**(3): p. 643-9.
30. Gaspari, A.A., *Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis*. J Am Acad Dermatol, 2006. **54**(3 Suppl 2): p. S67-80.
31. Schottelius, A.J., L.L. Moldawer, C.A. Dinarello, K. Asadullah, W. Sterry, and C.K. Edwards, 3rd, *Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis*. Exp Dermatol, 2004. **13**(4): p. 193-222.
32. Chomarat, P., C. Dantin, L. Bennett, J. Banchereau, and A.K. Palucka, *TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2262-9.
33. Ritter, U., A. Meissner, J. Ott, and H. Korner, *Analysis of the maturation process of dendritic cells deficient for TNF and lymphotoxin-alpha reveals an essential role for TNF*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(2): p. 216-22.

34. Guilloteau, K., I. Paris, N. Pedretti, K. Boniface, F. Juchaux, V. Huguier, G. Guillet, F.X. Bernard, J.C. Lecron, and F. Morel, *Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1{alpha}, and TNF-{alpha} Recapitulates Some Features of Psoriasis*. J Immunol, 2010.
35. Chiricozzi, A., E. Guttman-Yassky, M. Suarez-Farinas, K.E. Nogales, S. Tian, I. Cardinale, S. Chimenti, and J.G. Krueger, *Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(3): p. 677-87.
36. Albanesi, C., A. Cavani, and G. Girolomoni, *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*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 494-502.
37. Goodman, W.A., A.D. Levine, J.V. Massari, H. Sugiyama, T.S. McCormick, and K.D. Cooper, *IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3170-6.
38. Grossman, R.M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D.P. Murphy, L.T. May, T.S. Kupper, P.B. Sehgal, and A.B. Gottlieb, *Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(16): p. 6367-71.
39. Neuner, P., A. Urbanski, F. Trautinger, A. Moller, R. Kirnbauer, A. Kapp, E. Schopf, T. Schwarz, and T.A. Luger, *Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(1): p. 27-33.
40. Mattozzi, C., M. Salvi, S. D'Epiro, S. Giancristoforo, L. Macaluso, C. Luci, K. Lal, S. Calvieri, and A.G. Richetta, *Importance of regulatory T cells in the pathogenesis of psoriasis: review of the literature*. Dermatology, 2013. **227**(2): p. 134-45.
41. Austin, L.M., M. Ozawa, T. Kikuchi, I.B. Walters, and J.G. Krueger, *The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(5): p. 752-9.
42. Schlaak, J.F., M. Buslau, W. Jochum, E. Hermann, M. Girndt, H. Gallati, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and B. Fleischer, *T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(2): p. 145-9.

43. Peters, A., Y. Lee, and V.K. Kuchroo, *The many faces of Th17 cells*. *Curr Opin Immunol*, 2011. **23**(6): p. 702-6.
44. Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua, *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. *J Exp Med*, 2005. **201**(2): p. 233-40.
45. Li, J., X. Chen, Z. Liu, Q. Yue, and H. Liu, *Expression of Th17 cytokines in skin lesions of patients with psoriasis*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2007. **27**(3): p. 330-2.
46. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver, *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
47. Ha, H.L., H. Wang, P. Pisitkun, J.C. Kim, I. Tassi, W. Tang, M.I. Morasso, M.C. Udey, and U. Siebenlist, *IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(33): p. E3422-31.
48. Jia, K., Y. Zhang, W. Ma, X. Zhang, and Q. Sun, *Effect of interleukin-17 on receptor-interacting protein 4 expression and keratinocyte proliferation*. *Exp Ther Med*, 2015. **10**(1): p. 374-378.
49. Fitch, E., E. Harper, I. Skorcheva, S.E. Kurtz, and A. Blauvelt, *Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines*. *Curr Rheumatol Rep*, 2007. **9**(6): p. 461-7.
50. Ma, H.L., S. Liang, J. Li, L. Napierata, T. Brown, S. Benoit, M. Senices, D. Gill, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, C. Nickerson-Nutter, L.A. Fouser, and D.A. Young, *IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(2): p. 597-607.
51. Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, and R. Sabat, *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 241-54.
52. Teunissen, M.B., C.W. Koomen, R. de Waal Malefyt, E.A. Wierenga, and J.D. Bos, *Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes*. *J Invest Dermatol*, 1998. **111**(4): p. 645-9.
53. Carrier, Y., H.L. Ma, H.E. Ramon, L. Napierata, C. Small, M. O'Toole, D.A. Young, L.A. Fouser, C. Nickerson-Nutter, M. Collins, K. Dunussi-Joannopoulos, and Q.G.

- Medley, *Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: implications in psoriasis pathogenesis*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(12): p. 2428-37.
54. Detmar, M., L.F. Brown, K.P. Claffey, K.T. Yeo, O. Kocher, R.W. Jackman, B. Berse, and H.F. Dvorak, *Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 1141-6.
55. Raychaudhuri, S.P., S. Dutt, S.K. Raychaudhuri, M. Sanyal, and E.M. Farber, *Severe combined immunodeficiency mouse-human skin chimeras: a unique animal model for the study of psoriasis and cutaneous inflammation*. Br J Dermatol, 2001. **144**(5): p. 931-9.
56. Carretero, M., S. Guerrero-Aspizua, and M. Del Rio, *Bioengineered skin humanized model of psoriasis*. Methods Mol Biol, 2013. **961**: p. 305-23.
57. Steinckwich, N., P. Myers, K.S. Janardhan, N.D. Flagler, D. King, J.G. Petranka, and J.W. Putney, *Role of the store-operated calcium entry protein, STIM1, in neutrophil chemotaxis and infiltration into a murine model of psoriasis-inflamed skin*. FASEB J, 2015. **29**(7): p. 3003-13.
58. Fritsch, P.O., F. Gschnait, G. Kaaserer, W. Brenner, S. Chaikittisilpa, H. Honigsmann, and K. Wolff, *PUVA suppresses the proliferative stimulus produced by stripping on hairless mice*. J Invest Dermatol, 1979. **73**(2): p. 188-90.
59. Li, A.G., D. Wang, X.H. Feng, and X.J. Wang, *Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder*. EMBO J, 2004. **23**(8): p. 1770-81.
60. Sano, S., K.S. Chan, S. Carbajal, J. Clifford, M. Peavey, K. Kiguchi, S. Itami, B.J. Nickoloff, and J. DiGiovanni, *Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 43-9.
61. Zenz, R., R. Eferl, L. Kenner, L. Florin, L. Hummerich, D. Mehic, H. Scheuch, P. Angel, E. Tschachler, and E.F. Wagner, *Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 369-75.
62. Mee, J.B., C.M. Johnson, N. Morar, F. Burslem, and R.W. Groves, *The psoriatic transcriptome closely resembles that induced by interleukin-1 in cultured*

- keratinocytes: dominance of innate immune responses in psoriasis*. Am J Pathol, 2007. **171**(1): p. 32-42.
63. Bracke, S., E. Desmet, S. Guerrero-Aspizua, S.G. Tjabringa, J. Schalkwijk, M. Van Gele, M. Carretero, and J. Lambert, *Identifying targets for topical RNAi therapeutics in psoriasis: assessment of a new in vitro psoriasis model*. Arch Dermatol Res, 2013. **305**(6): p. 501-12.
64. Semini, G., A. Hildmann, A. Klein, L. Lucka, M. Schon, M.P. Schon, V. Shmanai, and K. Danker, *Inositol-C2-PAF down-regulates components of the antigen presentation machinery in a 2D-model of epidermal inflammation*. Biochem Pharmacol, 2014. **87**(3): p. 477-88.
65. Baden, H.P., J. Kubilus, J.C. Kvedar, M.L. Steinberg, and S.R. Wolman, *Isolation and characterization of a spontaneously arising long-lived line of human keratinocytes (NM 1)*. In Vitro Cell Dev Biol, 1987. **23**(3): p. 205-13.
66. Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig, *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. J Cell Biol, 1988. **106**(3): p. 761-71.
67. Allen-Hoffmann, B.L., S.J. Schlosser, C.A. Ivarie, C.A. Sattler, L.F. Meisner, and S.L. O'Connor, *Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(3): p. 444-55.
68. Lehman, T.A., R. Modali, P. Boukamp, J. Stanek, W.P. Bennett, J.A. Welsh, R.A. Metcalf, M.R. Stampfer, N. Fusenig, E.M. Rogan, and et al., *p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines*. Carcinogenesis, 1993. **14**(5): p. 833-9.
69. Farber, E.M. and M.L. Nall, *The natural history of psoriasis in 5,600 patients*. Dermatologica, 1974. **148**(1): p. 1-18.
70. S3 - Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris, Update 2017, www.awmf.org, Stand 06.07.2018
71. Balak, D.M.W., S. Gerdes, A. Parodi, and L. Salgado-Boquete, *Long-term Safety of Oral Systemic Therapies for Psoriasis: A Comprehensive Review of the Literature*. Dermatol Ther (Heidelb), 2020.
72. Dommasch, E.D., K. Abuabara, D.B. Shin, J. Nguyen, A.B. Troxel, and J.M. Gelfand, *The risk of infection and malignancy with tumor necrosis factor antagonists in adults with psoriatic disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. J Am Acad Dermatol, 2011. **64**(6): p. 1035-50.

73. Bongartz, T., A.J. Sutton, M.J. Sweeting, I. Buchan, E.L. Matteson, and V. Montori, *Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials*. JAMA, 2006. **295**(19): p. 2275-85.
74. Chimenti, M.S., D. Graceffa, and R. Perricone, *Anti-TNF α discontinuation in rheumatoid and psoriatic arthritis: is it possible after disease remission?* Autoimmun Rev, 2011. **10**(10): p. 636-40.
75. Wozel, G., [*Etanercept. An effective TNF alpha-antagonist in the treatment of psoriatic arthritis and chronic plaque psoriasis*]. Hautarzt, 2005. **56**(9): p. 819-30.
76. Yeilding, N., P. Szapary, C. Brodmerkel, J. Benson, M. Plotnick, H. Zhou, K. Goyal, B. Schenkel, J. Giles-Komar, M.A. Mascelli, and C. Guzzo, *Development of the IL-12/23 antagonist ustekinumab in psoriasis: past, present, and future perspectives-an update*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1263**: p. 1-12.
77. Segal, B.M., C.S. Constantinescu, A. Raychaudhuri, L. Kim, R. Fidelus-Gort, L.H. Kasper, and M.S.I. Ustekinumab, *Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study*. Lancet Neurol, 2008. **7**(9): p. 796-804.
78. Papp, K.A., R.G. Langley, M. Lebwohl, G.G. Krueger, P. Szapary, N. Yeilding, C. Guzzo, M.C. Hsu, Y. Wang, S. Li, L.T. Dooley, K. Reich, and P.s. investigators, *Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2)*. Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1675-84.
79. Garnock-Jones, K.P., *Secukinumab: A Review in Moderate to Severe Plaque Psoriasis*. Am J Clin Dermatol, 2015. **16**(4): p. 323-30.
80. Bauer, E., J. Lucier, and D.E. Furst, *Brodalumab -an IL-17RA monoclonal antibody for psoriasis and psoriatic arthritis*. Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(6): p. 883-93.
81. Dyring-Andersen, B., L. Skov, and C. Zachariae, *Ixekizumab for treatment of psoriasis*. Expert Rev Clin Immunol, 2015. **11**(4): p. 435-42.
82. Papp, K.A., K. Reich, C. Paul, A. Blauvelt, W. Baran, C. Bolduc, D. Toth, R.G. Langley, J. Cather, A.B. Gottlieb, D. Thaci, J.G. Krueger, C.B. Russell, C.E. Milmont, J. Li, P.A. Klekotka, G. Kricorian, and A. Nirula, *A prospective phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis*. Br J Dermatol, 2016. **175**(2): p. 273-86.

83. Ärzteschaft, A.m.k.d.d., *Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft: „Aus der UAW-Datenbank“ Induktion und/oder Demaskierung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen unter Secukinumab (Cosentyx ®) Literatur*. Dtsch Arztebl International, 2018. **115**(14): p. 672-4.
84. Ferrara, N., *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(10): p. 795-803.
85. Keating, G.M., *Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer*. Drugs, 2014. **74**(16): p. 1891-925.
86. European Medicines Agency, URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/avastin>, Access Date: 28.03.2021
87. Jose, V., S. Radhakrishna, P. Pipalava, and I. Singh, *Bevacizumab for eye diseases - Legal, regulatory, and ethical overview*. Indian J Pharmacol, 2019. **51**(6): p. 377-383.
88. Datta-Mitra, A., N.K. Riar, and S.P. Raychaudhuri, *Remission of psoriasis and psoriatic arthritis during bevacizumab therapy for renal cell cancer*. Indian J Dermatol, 2014. **59**(6): p. 632.
89. Hsu, L. and A.W. Armstrong, *JAK inhibitors: treatment efficacy and safety profile in patients with psoriasis*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 283617.
90. Fu, X.Y., C. Schindler, T. Improt, R. Aebersold, and J.E. Darnell, Jr., *The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7840-3.
91. Schindler, C., K. Shuai, V.R. Prezioso, and J.E. Darnell, Jr., *Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor*. Science, 1992. **257**(5071): p. 809-13.
92. Levy, D.E. and J.E. Darnell, Jr., *Stats: transcriptional control and biological impact*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 651-62.
93. Kisseleva, T., S. Bhattacharya, J. Braunstein, and C.W. Schindler, *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. Gene, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
94. Xu, X., Y.L. Sun, and T. Hoey, *Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain*. Science, 1996. **273**(5276): p. 794-7.

95. Vinkemeier, U., I. Moarefi, J.E. Darnell, Jr., and J. Kuriyan, *Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4*. Science, 1998. **279**(5353): p. 1048-52.
96. Begitt, A., T. Meyer, M. van Rossum, and U. Vinkemeier, *Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10418-23.
97. Zhang, T., W.H. Kee, K.T. Seow, W. Fung, and X. Cao, *The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7132-9.
98. Gupta, S., H. Yan, L.H. Wong, S. Ralph, J. Krolewski, and C. Schindler, *The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals*. EMBO J, 1996. **15**(5): p. 1075-84.
99. Shuai, K., C.M. Horvath, L.H. Huang, S.A. Qureshi, D. Cowburn, and J.E. Darnell, Jr., *Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions*. Cell, 1994. **76**(5): p. 821-8.
100. Schindler, C. and I. Strehlow, *Cytokines and STAT signaling*. Adv Pharmacol, 2000. **47**: p. 113-74.
101. Decker, T. and P. Kovarik, *Serine phosphorylation of STATs*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2628-37.
102. Inoue, M., M. Minami, M. Matsumoto, T. Kishimoto, and S. Akira, *The amino acid residues immediately carboxyl-terminal to the tyrosine phosphorylation site contribute to interleukin 6-specific activation of signal transducer and activator of transcription 3*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9550-5.
103. Mohr, A., N. Chatain, T. Domszalai, N. Rinis, M. Sommerauer, M. Vogt, and G. Muller-Newen, *Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(6-7): p. 524-32.
104. Sano, S., K.S. Chan, and J. DiGiovanni, *Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases*. J Dermatol Sci, 2008. **50**(1): p. 1-14.
105. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-37.

106. Olayioye, M.A., I. Beuvink, K. Horsch, J.M. Daly, and N.E. Hynes, *ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17209-18.
107. Simon, A.R., H.G. Vikis, S. Stewart, B.L. Fanburg, B.H. Cochran, and K.L. Guan, *Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase*. Science, 2000. **290**(5489): p. 144-7.
108. Faruqi, T.R., D. Gomez, X.R. Bustelo, D. Bar-Sagi, and N.C. Reich, *Rac1 mediates STAT3 activation by autocrine IL-6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9014-9.
109. Debidda, M., L. Wang, H. Zang, V. Poli, and Y. Zheng, *A role of STAT3 in Rho GTPase-regulated cell migration and proliferation*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17275-85.
110. Wells, J.A. and A.M. de Vos, *Hematopoietic receptor complexes*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 609-34.
111. Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi, *Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2548-56.
112. Boulanger, M.J., A.J. Bankovich, T. Kortemme, D. Baker, and K.C. Garcia, *Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 577-89.
113. Benigni, F., G. Fantuzzi, S. Sacco, M. Sironi, P. Pozzi, C.A. Dinarello, J.D. Sipe, V. Poli, M. Cappelletti, G. Paonessa, D. Pennica, N. Panayotatos, and P. Ghezzi, *Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1*. Blood, 1996. **87**(5): p. 1851-4.
114. Hirano, T., T. Matsuda, and K. Nakajima, *Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily*. Stem Cells, 1994. **12**(3): p. 262-77.
115. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 6934-8.
116. Kotenko, S.V. and S. Pestka, *Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2557-65.

117. Ihle, J.N., *The Stat family in cytokine signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(2): p. 211-7.
118. Remy, I., I.A. Wilson, and S.W. Michnick, *Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change*. Science, 1999. **283**(5404): p. 990-3.
119. Yamanaka, Y., K. Nakajima, T. Fukada, M. Hibi, and T. Hirano, *Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation*. EMBO J, 1996. **15**(7): p. 1557-65.
120. Ohtani, T., K. Ishihara, T. Atsumi, K. Nishida, Y. Kaneko, T. Miyata, S. Itoh, M. Narimatsu, H. Maeda, T. Fukada, M. Itoh, H. Okano, M. Hibi, and T. Hirano, *Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses*. Immunity, 2000. **12**(1): p. 95-105.
121. Alonzi, T., D. Maritano, B. Gorgoni, G. Rizzuto, C. Libert, and V. Poli, *Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1621-32.
122. Blumberg, H., D. Conklin, W.F. Xu, A. Grossmann, T. Brender, S. Carollo, M. Eagan, D. Foster, B.A. Haldeman, A. Hammond, H. Haugen, L. Jelinek, J.D. Kelly, K. Madden, M.F. Maurer, J. Parrish-Novak, D. Prunkard, S. Sexson, C. Sprecher, K. Waggle, J. West, T.E. Whitmore, L. Yao, M.K. Kuechle, B.A. Dale, and Y.A. Chandrasekher, *Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function*. Cell, 2001. **104**(1): p. 9-19.
123. Takeda, K., T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto, and S. Akira, *Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice*. J Immunol, 1998. **161**(9): p. 4652-60.
124. Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve, *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334** (Pt 2): p. 297-314.
125. Fukada, T., M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, Y. Fujitani, T. Yamaguchi, K. Nakajima, and T. Hirano, *Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis*. Immunity, 1996. **5**(5): p. 449-60.

126. Hirano, T., *Interleukin 6 and its receptor: ten years later*. *Int Rev Immunol*, 1998. **16**(3-4): p. 249-84.
127. Senaldi, G., B.C. Varnum, U. Sarmiento, C. Starnes, J. Lile, S. Scully, J. Guo, G. Elliott, J. McNinch, C.L. Shaklee, D. Freeman, F. Manu, W.S. Simonet, T. Boone, and M.S. Chang, *Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11458-63.
128. Dalrymple, S.A., L.A. Lucian, R. Slattery, T. McNeil, D.M. Aud, S. Fuchino, F. Lee, and R. Murray, *Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia*. *Infect Immun*, 1995. **63**(6): p. 2262-8.
129. Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Kohler, *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice*. *Nature*, 1994. **368**(6469): p. 339-42.
130. Beagley, K.W., J.H. Eldridge, F. Lee, H. Kiyono, M.P. Everson, W.J. Koopman, T. Hirano, T. Kishimoto, and J.R. McGhee, *Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells*. *J Exp Med*, 1989. **169**(6): p. 2133-48.
131. Maddur, M.S., P. Miossec, S.V. Kaveri, and J. Bayry, *Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies*. *Am J Pathol*, 2012. **181**(1): p. 8-18.
132. Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D.E. Levy, W.J. Leonard, and D.R. Littman, *IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 967-74.
133. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo, *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
134. Ellis, C.N., G.G. Krueger, and G. Alefacept Clinical Study, *Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(4): p. 248-55.
135. Gottlieb, S.L., P. Gilleaudeau, R. Johnson, L. Estes, T.G. Woodworth, A.B. Gottlieb, and J.G. Krueger, *Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin*

- (*DAB389IL-2*) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med*, 1995. **1**(5): p. 442-7.
136. Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto, *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130*. *Cell*, 1989. **58**(3): p. 573-81.
137. Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga, *Interleukin-6 family of cytokines and gp130*. *Blood*, 1995. **86**(4): p. 1243-54.
138. Boniface, K., C. Diveu, F. Morel, N. Pedretti, J. Froger, E. Ravon, M. Garcia, E. Venereau, L. Preisser, E. Guignouard, G. Guillet, G. Dagregorio, J. Pene, J.P. Moles, H. Yssel, S. Chevalier, F.X. Bernard, H. Gascan, and J.C. Lecron, *Oncostatin M secreted by skin infiltrating T lymphocytes is a potent keratinocyte activator involved in skin inflammation*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4615-22.
139. Li, C., F. Zhang, M. Lin, and J. Liu, *Induction of S100A9 gene expression by cytokine oncostatin M in breast cancer cells through the STAT3 signaling cascade*. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **87**(2): p. 123-34.
140. Horvath, C.M., *STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(10): p. 496-502.
141. Chen, X., U. Vinkemeier, Y. Zhao, D. Jeruzalmi, J.E. Darnell, Jr., and J. Kuriyan, *Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA*. *Cell*, 1998. **93**(5): p. 827-39.
142. Schindler, U., P. Wu, M. Rothe, M. Brasseur, and S.L. McKnight, *Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity*. *Immunity*, 1995. **2**(6): p. 689-97.
143. Darnell, J.E., Jr., *STATs and gene regulation*. *Science*, 1997. **277**(5332): p. 1630-5.
144. Liu, L., K.M. McBride, and N.C. Reich, *STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(23): p. 8150-5.
145. Lillemeier, B.F., M. Koster, and I.M. Kerr, *STAT1 from the cell membrane to the DNA*. *EMBO J*, 2001. **20**(10): p. 2508-17.
146. Decker, T., P. Kovarik, and A. Meinke, *GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression*. *J Interferon Cytokine Res*, 1997. **17**(3): p. 121-34.

147. Sano, S., S. Itami, K. Takeda, M. Tarutani, Y. Yamaguchi, H. Miura, K. Yoshikawa, S. Akira, and J. Takeda, *Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis*. EMBO J, 1999. **18**(17): p. 4657-68.
148. Tsai, M.L., H.P. Huang, J.D. Hsu, Y.R. Lai, Y.P. Hsiao, F.J. Lu, and H.R. Chang, *Topical N-acetylcysteine accelerates wound healing in vitro and in vivo via the PKC/Stat3 pathway*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(5): p. 7563-78.
149. Niu, G., T. Bowman, M. Huang, S. Shivers, D. Reintgen, A. Daud, A. Chang, A. Kraker, R. Jove, and H. Yu, *Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth*. Oncogene, 2002. **21**(46): p. 7001-10.
150. Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira, *Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3801-4.
151. Bowman, T., R. Garcia, J. Turkson, and R. Jove, *STATs in oncogenesis*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2474-88.
152. Bromberg, J., *Stat proteins and oncogenesis*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1139-42.
153. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 798-809.
154. Ng, D.C., B.H. Lin, C.P. Lim, G. Huang, T. Zhang, V. Poli, and X. Cao, *Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin*. J Cell Biol, 2006. **172**(2): p. 245-57.
155. Wegrzyn, J., R. Potla, Y.J. Chwae, N.B. Sepuri, Q. Zhang, T. Koeck, M. Derecka, K. Szczepanek, M. Szelag, A. Gornicka, A. Moh, S. Moghaddas, Q. Chen, S. Bobbili, J. Cichy, J. Dulak, D.P. Baker, A. Wolfman, D. Stuehr, M.O. Hassan, X.Y. Fu, N. Avadhani, J.I. Drake, P. Fawcett, E.J. Lesnefsky, and A.C. Larner, *Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration*. Science, 2009. **323**(5915): p. 793-7.
156. Wegenka, U.M., J. Buschmann, C. Luttkicken, P.C. Heinrich, and F. Horn, *Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(1): p. 276-88.
157. Wegenka, U.M., C. Luttkicken, J. Buschmann, J. Yuan, F. Lottspeich, W. Muller-Esterl, C. Schindler, E. Roeb, P.C. Heinrich, and F. Horn, *The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to*

- members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family. Mol Cell Biol, 1994. 14(5): p. 3186-96.*
158. Andres, R.M., A. Hald, C. Johansen, K. Kragballe, and L. Iversen, *Studies of Jak/STAT3 expression and signalling in psoriasis identifies STAT3-Ser727 phosphorylation as a modulator of transcriptional activity. Exp Dermatol, 2013. 22(5): p. 323-8.*
159. Zeng, F., H. Liu, D. Lu, Q. Liu, H. Chen, and F. Zheng, *Integrated analysis of gene expression profiles identifies transcription factors potentially involved in psoriasis pathogenesis. J Cell Biochem, 2019. 120(8): p. 12582-12594.*
160. Choudhary, S., D. Pradhan, N.S. Khan, H. Singh, G. Thomas, and A. Jain, *Decoding Psoriasis: Integrated Bioinformatics Approach to Understand Hub Genes and Involved Pathways. Curr Pharm Des, 2020.*
161. Orecchia, V., G. Regis, B. Tassone, C. Valenti, L. Avalle, S. Saoncella, E. Calautti, and V. Poli, *Constitutive STAT3 activation in epidermal keratinocytes enhances cell clonogenicity and favours spontaneous immortalization by opposing differentiation and senescence checkpoints. Exp Dermatol, 2015. 24(1): p. 29-34.*
162. Bhattacharya, S., J.C. Kim, Y. Ogawa, G. Nakato, V. Nagle, S.R. Brooks, M.C. Udey, and M.I. Morasso, *DLX3-Dependent STAT3 Signaling in Keratinocytes Regulates Skin Immune Homeostasis. J Invest Dermatol, 2018. 138(5): p. 1052-1061.*
163. Hertle, M.D., M.D. Kubler, I.M. Leigh, and F.M. Watt, *Aberrant integrin expression during epidermal wound healing and in psoriatic epidermis. J Clin Invest, 1992. 89(6): p. 1892-901.*
164. McKenzie, R.C. and E. Sabin, *Aberrant signalling and transcription factor activation as an explanation for the defective growth control and differentiation of keratinocytes in psoriasis: a hypothesis. Exp Dermatol, 2003. 12(4): p. 337-45.*
165. O'Donnell, M.C., J.N. Siegel, and B.A. Fiedel, *Platelet activating factor: an inhibitor of neutrophil activation? Clin Exp Immunol, 1981. 43(1): p. 135-42.*
166. Stimler, N.P., C.M. Bloor, T.E. Hugli, R.L. Wykle, C.E. McCall, and J.T. O'Flaherty, *Anaphylactic actions of platelet-activating factor. Am J Pathol, 1981. 105(1): p. 64-9.*
167. Prescott, S.M., G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre, *Platelet-activating factor. J Biol Chem, 1990. 265(29): p. 17381-4.*

168. Mollinedo, F., R. Martinez-Dalmau, and M. Modolell, *Early and selective induction of apoptosis in human leukemic cells by the alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH₃*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **192**(2): p. 603-9.
169. Mollinedo, F., J.L. Fernandez-Luna, C. Gajate, B. Martin-Martin, A. Benito, R. Martinez-Dalmau, and M. Modolell, *Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L)*. *Cancer Res*, 1997. **57**(7): p. 1320-8.
170. Ngwenya, B.Z., N.P. Fiavey, and M.M. Mogashoa, *Anti-neoplastic action of peritoneal macrophages following oral administration of ether analogues of lysophospholipids*. *Eur J Cancer*, 1992. **28A**(10): p. 1637-42.
171. Mollinedo, F., J. de la Iglesia-Vicente, C. Gajate, A. Estella-Hermoso de Mendoza, J.A. Villa-Pulgarin, M. de Frias, G. Roue, J. Gil, D. Colomer, M.A. Campanero, and M.J. Blanco-Prieto, *In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(7): p. 2046-54.
172. Estella-Hermoso de Mendoza, A., V. Preat, F. Mollinedo, and M.J. Blanco-Prieto, *In vitro and in vivo efficacy of edelfosine-loaded lipid nanoparticles against glioma*. *J Control Release*, 2011. **156**(3): p. 421-6.
173. Aznar, M.A., B. Lasa-Saracibar, A. Estella-Hermoso de Mendoza, and M.J. Blanco-Prieto, *Efficacy of edelfosine lipid nanoparticles in breast cancer cells*. *Int J Pharm*, 2013. **454**(2): p. 720-6.
174. Aznar, M.A., B. Lasa-Saracibar, and M.J. Blanco-Prieto, *Edelfosine lipid nanoparticles overcome multidrug resistance in K-562 leukemia cells by a caspase-independent mechanism*. *Mol Pharm*, 2014. **11**(8): p. 2650-8.
175. Unger, C., W. Damenz, E.A. Fleer, D.J. Kim, A. Breiser, P. Hilgard, J. Engel, G. Nagel, and H. Eibl, *Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo*. *Acta Oncol*, 1989. **28**(2): p. 213-7.
176. Pachioni Jde, A., J.G. Magalhaes, E.J. Lima, M. Bueno Lde, J.F. Barbosa, M.M. de Sa, and C.O. Rangel-Yagui, *Alkylphospholipids - a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum*. *J Pharm Pharm Sci*, 2013. **16**(5): p. 742-59.

177. Leonard, R., J. Hardy, G. van Tienhoven, S. Houston, P. Simmonds, M. David, and J. Mansi, *Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(21): p. 4150-9.
178. Mickleit, M., T. Wieder, M. Arnold, C.C. Geilen, J. Mulzer, and W. Reutter, *A Glucose-Containing Ether Lipid (Glc-PAF) as an Antiproliferative Analogue of the Platelet-Activating Factor*. Angewandte Chemie International Edition, 1998. **37**(3): p. 351-353.
179. Andreesen, R., M. Modolell, H.U. Weltzien, H. Eibl, H.H. Common, G.W. Lohr, and P.G. Munder, *Selective destruction of human leukemic cells by alkyl-lysophospholipids*. Cancer Res, 1978. **38**(11 Pt 1): p. 3894-9.
180. Modolell, M., R. Andreesen, W. Pahlke, U. Brugger, and P.G. Munder, *Disturbance of phospholipid metabolism during the selective destruction of tumor cells induced by alkyl-lysophospholipids*. Cancer Res, 1979. **39**(11): p. 4681-6.
181. Vrablic, A.S., C.D. Albright, C.N. Craciunescu, R.I. Salganik, and S.H. Zeisel, *Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes*. FASEB J, 2001. **15**(10): p. 1739-44.
182. Nosedá, A., P.L. Godwin, and E.J. Modest, *Effects of antineoplastic ether lipids on model and biological membranes*. Biochim Biophys Acta, 1988. **945**(1): p. 92-100.
183. Gajate, C. and F. Mollinedo, *The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3860-3.
184. Lazenby, C.M., M.G. Thompson, and J.A. Hickman, *Elevation of leukemic cell intracellular calcium by the ether lipid SRI 62-834*. Cancer Res, 1990. **50**(11): p. 3327-30.
185. Hoffman, D.R., V.L. Thomas, and F. Snyder, *Inhibition of cellular transport systems by alkyl phospholipid analogs in HL-60 human leukemia cells*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1127**(1): p. 74-80.
186. Helfman, D.M., K.C. Barnes, J.M. Kinkade, Jr., W.R. Vogler, M. Shoji, and J.F. Kuo, *Phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in various types of leukemic cells from human patients and in human leukemic cell*

- lines HL60 and K562, and its inhibition by alkyl-lysophospholipid.* Cancer Res, 1983. **43**(6): p. 2955-61.
187. Ruiter, G.A., S.F. Zerp, H. Bartelink, W.J. van Blitterswijk, and M. Verheij, *Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis.* Cancer Res, 1999. **59**(10): p. 2457-63.
188. Ruiter, G.A., S.F. Zerp, H. Bartelink, W.J. van Blitterswijk, and M. Verheij, *Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway.* Anticancer Drugs, 2003. **14**(2): p. 167-73.
189. Na, H.K. and Y.J. Surh, *The antitumor ether lipid edelfosine (ET-18-O-CH₃) induces apoptosis in H-ras transformed human breast epithelial cells: by blocking ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases as potential targets.* Asia Pac J Clin Nutr, 2008. **17 Suppl 1**: p. 204-7.
190. Fischer, A., D. Muller, M. Zimmermann-Kordmann, B. Kleuser, M. Mickleit, S. Laabs, W. Lowe, F. Cantagrel, W. Reutter, and K. Danker, *The ether lipid inositol-C2-PAF is a potent inhibitor of cell proliferation in HaCaT cells.* Chembiochem, 2006. **7**(3): p. 441-9.
191. Fischer, A., *Aufklärung der Wirkung eines neuartigen, modifizierten Phospholipidanalogs: Inositol-C2-PAF.* PhD thesis at the department of Biology, Chemistry and Pharmacy at Freie Universität Berlin, 2006.
192. von Haefen, C., J. Wendt, G. Semini, M. Siffringer, C. Belka, S. Radetzki, W. Reutter, P.T. Daniel, and K. Danker, *Synthetic glycosidated phospholipids induce apoptosis through activation of FADD, caspase-8 and the mitochondrial death pathway.* Apoptosis, 2011. **16**(6): p. 636-51.
193. Semini, G., A. Hildmann, H.U. Reissig, W. Reutter, and K. Danker, *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.* Biochem Pharmacol, 2011. **81**(8): p. 985-95.
194. Semini, G., A. Klein, and K. Danker, *Impact of alkylphospholipids on the gene expression profile of HaCaT cells.* Pharmacogenet Genomics, 2011. **21**(7): p. 375-87.
195. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

196. Pelz, C., S. Hackel, G. Semini, S. Schrotter, W. Bintig, S. Stricker, G. Mrawietz, A. Klein, L. Lucka, V. Shmanai, B. Eickholt, A. Hildmann, and K. Danker, *Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells*. Cell Oncol (Dordr), 2018. **41**(5): p. 505-516.
197. Barker, J.N., R.S. Mitra, C.E. Griffiths, V.M. Dixit, and B.J. Nickoloff, *Keratinocytes as initiators of inflammation*. Lancet, 1991. **337**(8735): p. 211-4.
198. Du, Y., S. Jiang, L. Cheng, and J. Liu, *JAK/STAT and VEGF/PAK1 signaling as emerging targets for topical treatment of psoriasis: a pilot study*. Int J Clin Exp Pathol, 2020. **13**(12): p. 3111-3119.
199. Miyoshi, K., M. Takaishi, K. Nakajima, M. Ikeda, T. Kanda, M. Tarutani, T. Iiyama, N. Asao, J. DiGiovanni, and S. Sano, *Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(1): p. 108-17.
200. Palombo, R., I. Savini, L. Avigliano, S. Madonna, A. Cavani, C. Albanesi, A. Mauriello, G. Melino, and A. Terrinoni, *Luteolin-7-glucoside inhibits IL-22/STAT3 pathway, reducing proliferation, acanthosis, and inflammation in keratinocytes and in mouse psoriatic model*. Cell Death Dis, 2016. **7**(8): p. e2344.
201. Miao, X., Y. Xiang, W. Mao, Y. Chen, Q. Li, and B. Fan, *TRIM27 promotes IL-6-induced proliferation and inflammation factor production by activating STAT3 signaling in HaCaT cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2020. **318**(2): p. C272-C281.
202. Silver, D.L., H. Naora, J. Liu, W. Cheng, and D.J. Montell, *Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility*. Cancer Res, 2004. **64**(10): p. 3550-8.
203. Braun, D.A., M. Fribourg, and S.C. Sealfon, *Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation*. J Biol Chem, 2013. **288**(5): p. 2986-93.
204. Kenis, G., C. Teunissen, R. De Jongh, E. Bosmans, H. Steinbusch, and M. Maes, *Stability of interleukin 6, soluble interleukin 6 receptor, interleukin 10 and CC16 in human serum*. Cytokine, 2002. **19**(5): p. 228-35.
205. Haan, S., M. Kortylewski, I. Behrmann, W. Muller-Esterl, P.C. Heinrich, and F. Schaper, *Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation*. Biochem J, 2000. **345 Pt 3**: p. 417-21.

206. Kretzschmar, A.K., M.C. Dinger, C. Henze, K. Brocke-Heidrich, and F. Horn, *Analysis of Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) dimerization by fluorescence resonance energy transfer in living cells*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 2): p. 289-97.
207. Schroder, M., K.M. Kroeger, H.D. Volk, K.A. Eidne, and G. Grutz, *Preassociation of nonactivated STAT3 molecules demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer: a new model of STAT activation?* *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(5): p. 792-7.
208. Vogt, M., T. Domszalai, D. Kleshchanok, S. Lehmann, A. Schmitt, V. Poli, W. Richter, and G. Muller-Newen, *The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 6): p. 900-9.
209. Braunstein, J., S. Brutsaert, R. Olson, and C. Schindler, *STATs dimerize in the absence of phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(36): p. 34133-40.
210. Novak, U., H. Ji, V. Kanagasundaram, R. Simpson, and L. Paradiso, *STAT3 forms stable homodimers in the presence of divalent cations prior to activation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **247**(3): p. 558-63.
211. Li, W.X., *Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling*. *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(11): p. 545-51.
212. Herrmann, A., U. Sommer, A.L. Prana, B. Giese, A. Kuster, S. Haan, W. Becker, P.C. Heinrich, and G. Muller-Newen, *STAT3 is enriched in nuclear bodies*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 2): p. 339-49.
213. Yamamoto, K., A. Mizumoto, K. Nishimura, A. Uda, A. Mukai, K. Yamashita, M. Kume, H. Makimoto, T. Bito, C. Nishigori, T. Nakagawa, T. Hirano, and M. Hirai, *Association of toxicity of sorafenib and sunitinib for human keratinocytes with inhibition of signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3)*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e102110.
214. Altieri, D.C., *New wirings in the survivin networks*. *Oncogene*, 2008. **27**(48): p. 6276-84.
215. Fukuda, S. and L.M. Pelus, *Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(5): p. 1087-98.
216. Bongiovanni, L., E.J. Muller, and L. Della Salda, *Survivin in skin pathologies*. *Exp Dermatol*, 2011. **20**(6): p. 457-63.

217. Abdou, A.G. and H.M. Hanout, *Evaluation of survivin and NF-kappaB in psoriasis, an immunohistochemical study*. J Cutan Pathol, 2008. **35**(5): p. 445-51.
218. Markham, T., C. Mathews, S. Rogers, R. Mullan, B. Bresnihan, O. Fitzgerald, D.J. Veale, and U. Fearon, *Downregulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin in keratinocytes and endothelial cells in psoriasis skin following infliximab therapy*. Br J Dermatol, 2006. **155**(6): p. 1191-6.
219. Boniface, K., F.X. Bernard, M. Garcia, A.L. Gurney, J.C. Lecron, and F. Morel, *IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3695-702.
220. Hau, C.S., N. Kanda, S. Noda, A. Tatsuta, M. Kamata, S. Shibata, Y. Asano, S. Sato, S. Watanabe, and Y. Tada, *Visfatin enhances the production of cathelicidin antimicrobial peptide, human beta-defensin-2, human beta-defensin-3, and S100A7 in human keratinocytes and their orthologs in murine imiquimod-induced psoriatic skin*. Am J Pathol, 2013. **182**(5): p. 1705-17.
221. Madsen, P., H.H. Rasmussen, H. Leffers, B. Honore, K. Dejgaard, E. Olsen, J. Kiil, E. Walbum, A.H. Andersen, B. Basse, and et al., *Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(4): p. 701-12.
222. D'Amico, F., E. Skarmoutsou, M. Granata, C. Trovato, G.A. Rossi, and M.C. Mazarino, *S100A7: A rAMPing up AMP molecule in psoriasis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **32**: p. 97-104.
223. Eckert, R.L., A.M. Broome, M. Ruse, N. Robinson, D. Ryan, and K. Lee, *S100 proteins in the epidermis*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(1): p. 23-33.
224. Zheng, Y., F. Niyonsaba, H. Ushio, S. Ikeda, I. Nagaoka, K. Okumura, and H. Ogawa, *Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation*. Immunology, 2008. **124**(3): p. 357-67.
225. Leclerc, E., G. Fritz, S.W. Vetter, and C.W. Heizmann, *Binding of S100 proteins to RAGE: an update*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(6): p. 993-1007.
226. Hegyi, Z., S. Zwicker, D. Bureik, M. Peric, S. Koglin, A. Batycka-Baran, J.C. Prinz, T. Ruzicka, J. Schaubert, and R. Wolf, *Vitamin D analog calcipotriol suppresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 "alarmins" psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in psoriasis*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(5): p. 1416-24.

227. Mate, J.L., A. Ariza, X. Roca, D. Lopez, C. Ferrandiz, J. Perez-Piteira, and J.J. Navas-Palacios, *expression patterns of cyclins D1 and E in condyloma acuminatum in comparison with psoriatic proliferative lesions*. J Pathol, 1998. **184**(1): p. 83-8.
228. Abou, E.L.E.M., N. Nagui, D. Mahgoub, N. El-Eishi, M. Fawzy, A. El-Tawdy, R. Abdel Hay, and L. Rashed, *Expression of cyclin D1 and p16 in psoriasis before and after phototherapy*. Clin Exp Dermatol, 2010. **35**(7): p. 781-5.
229. Carpenter, R.L. and H.W. Lo, *STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers*. Cancers (Basel), 2014. **6**(2): p. 897-925.
230. Luo, F., Y. Xu, M. Ling, Y. Zhao, W. Xu, X. Liang, R. Jiang, B. Wang, Q. Bian, and Q. Liu, *Arsenite evokes IL-6 secretion, autocrine regulation of STAT3 signaling, and miR-21 expression, processes involved in the EMT and malignant transformation of human bronchial epithelial cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **273**(1): p. 27-34.
231. Olejniczak-Staruch, I., J. Narbutt, I. Bednarski, A. Wozniacka, J. Sieniawska, M. Kraska-Gacka, J. Smigielski, and A. Lesiak, *Interleukin 22 and 6 serum concentrations decrease under long-term biologic therapy in psoriasis*. Postepy Dermatol Alergol, 2020. **37**(5): p. 705-711.
232. Chen, R.H., M.C. Chang, Y.H. Su, Y.T. Tsai, and M.L. Kuo, *Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23013-9.
233. Kristensen, D.M., M. Kalisz, and J.H. Nielsen, *Cytokine signalling in embryonic stem cells*. APMIS, 2005. **113**(11-12): p. 756-72.
234. Sano, S., M. Kira, S. Takagi, K. Yoshikawa, J. Takeda, and S. Itami, *Two distinct signaling pathways in hair cycle induction: Stat3-dependent and -independent pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13824-9.
235. Yu, Z.B., L. Bai, P. Qian, Y.B. Xiao, G.S. Wang, G.S. Qian, C.X. Bai, and J.X. Min, *Restoration of SOCS3 suppresses human lung adenocarcinoma cell growth by downregulating activation of Erk1/2, Akt apart from STAT3*. Cell Biol Int, 2009. **33**(9): p. 995-1001.
236. Kortylewski, M., F. Feld, K.D. Kruger, G. Bahrenberg, R.A. Roth, H.G. Joost, P.C. Heinrich, I. Behrmann, and A. Barthel, *Akt modulates STAT3-mediated gene*

- expression through a FKHR (FOXO1a)-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 2003. **278**(7): p. 5242-9.
237. Ghosh, M.K., P. Sharma, P.C. Harbor, S.O. Rahaman, and S.J. Haque, *PI3K-AKT pathway negatively controls EGFR-dependent DNA-binding activity of Stat3 in glioblastoma multiforme cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(49): p. 7290-300.
238. Harper, E.G., C. Guo, H. Rizzo, J.V. Lillis, S.E. Kurtz, I. Skorcheva, D. Purdy, E. Fitch, M. Iordanov, and A. Blauvelt, *Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(9): p. 2175-83.
239. Bae, H.C., S.H. Jeong, J.H. Kim, H. Lee, W.I. Ryu, M.G. Kim, E.D. Son, T.R. Lee, and S.W. Son, *RIP4 upregulates CCL20 expression through STAT3 signalling in cultured keratinocytes*. *Exp Dermatol*, 2018. **27**(10): p. 1126-1133.
240. Varshney, P. and N. Saini, *PI3K/AKT/mTOR activation and autophagy inhibition plays a key role in increased cholesterol during IL-17A mediated inflammatory response in psoriasis*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018. **1864**(5 Pt A): p. 1795-1803.
241. Heidenreich, R., M. Rocken, and K. Ghoreschi, *Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis*. *Int J Exp Pathol*, 2009. **90**(3): p. 232-48.
242. Das, P.K., O.J. de Boer, A. Visser, C.E. Verhagen, J.D. Bos, and S.T. Pals, *Differential expression of ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 by endothelial cells in psoriasis and contact dermatitis*. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 1994. **186**: p. 21-2.
243. Terajima, S., M. Higaki, Y. Igarashi, T. Nogita, and M. Kawashima, *An important role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of adhesion molecules in psoriasis*. *Arch Dermatol Res*, 1998. **290**(5): p. 246-52.
244. Wakita, H. and M. Takigawa, *E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are critical for initial trafficking of helper-inducer/memory T cells in psoriatic plaques*. *Arch Dermatol*, 1994. **130**(4): p. 457-63.
245. Schonthaler, H.B., R. Huggenberger, S.K. Wculek, M. Detmar, and E.F. Wagner, *Systemic anti-VEGF treatment strongly reduces skin inflammation in a mouse model of psoriasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(50): p. 21264-9.
246. Piotrowski, I., K. Kulcenty, and W. Suchorska, *Interplay between inflammation and cancer*. *Rep Pract Oncol Radiother*, 2020. **25**(3): p. 422-427.

247. Hirano, T., D. Hirayama, K. Wagatsuma, T. Yamakawa, Y. Yokoyama, and H. Nakase, *Immunological Mechanisms in Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(9).
248. Maru, G.B., K. Gandhi, A. Ramchandani, and G. Kumar, *The role of inflammation in skin cancer*. *Adv Exp Med Biol*, 2014. **816**: p. 437-69.
249. Chang, Q., E. Bournazou, P. Sansone, M. Berishaj, S.P. Gao, L. Daly, J. Wels, T. Theilen, S. Granitto, X. Zhang, J. Cotari, M.L. Alpaugh, E. de Stanchina, K. Manova, M. Li, M. Bonafe, C. Ceccarelli, M. Taffurelli, D. Santini, G. Altan-Bonnet, R. Kaplan, L. Norton, N. Nishimoto, D. Huszar, D. Lyden, and J. Bromberg, *The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis*. *Neoplasia*, 2013. **15**(7): p. 848-62.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Sebastian Stricker, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Inositol-C2-PAF: Ein Inhibitor des STAT3-Signalwegs“ 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 versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung).

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. 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.

Datum

Unterschrift

Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sebastian Stricker hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Pelz C, Häckel S, Semini G, Schrötter S, Bintig W, Stricker S, Mrawietz G, Klein A, Lucka L, Shmanai V, Eickholt B, Hildmann A, Danker K. Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2018 Oct;41(5):505-516. doi: 10.1007/s13402-018-0387-3. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30047091.

Alleinige Durchführung der Zellkulturarbeit, Western Blots, Quantifizierung und statistischen Auswertung der Versuche in HaCaT-Zellen, die in der Publikation in Abbildung 3b (Figure 3b) dargestellt sind.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Pelz C, Häckel S, Semini G, Schrötter S, Bintig W, Stricker S, Mrawietz G, Klein A, Lucka L, Shmanai V, Eickholt B, Hildmann A, Danker K. Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2018 Oct;41(5):505-516. doi: 10.1007/s13402-018-0387-3. Epub 2018 Jul 25. PMID: 30047091.

Danksagung

Bei Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Kerstin Danker möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken: Für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Einführung in die verschiedenen Methoden der biochemischen Laborarbeit und für das gemeinsame Planen und Besprechen von Experimenten und Ergebnissen. All das mit unendlicher Geduld, zielgerichtetem Fokus, begeisternder Motivation und stets mit beeindruckender Leidenschaft für die Biochemie.

Bei meinen Eltern, Ulrike und Wolfgang, möchte ich mich für die immerwährende Unterstützung bedanken. Mit Liebe, Verstand und Hingabe habt ihr mir ermöglicht zu sein, wer ich bin.

Ich danke Gudrun Mrawietz, der guten Seele des Labors, für die genauen Anleitungen und hilfreichen Beratungen bei so vielen Experimenten.

Ich danke Dr. rer. nat. Geo Semini, der mir die Grundlagen der Zellkultur, der Western Blot- und PCR-Technik beibrachte.

Ich danke Dr. med. Robin Wratil, dem besten Freund, den man sich wünschen kann, und einem exzellenten Wissenschaftler.

Ich danke meiner Lebensgefährtin Monika für Zeit, Geduld und Liebe.