

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

DISSERTATION

Charakterisierung der funktionellen Rolle von Wnt5a in Keratinozyten bei der Psoriasis vulgaris

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Susanne Donandt
aus Frankenthal / Pfalz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Sterry
 2. Prof. Dr. rer. nat. C. Birchmeier-Kohler
 3. Prof. Dr. med. H. Traupe

Datum der Promotion: 29.01.2010

Zusammenfassung

Psoriasis vulgaris ist eine komplexe, entzündliche Hauterkrankung, die sowohl durch veränderte Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten, als auch durch Aktivierung von Immunzellen gekennzeichnet ist. Obwohl verschiedene Regionen im menschlichen Genom mit der Krankheit assoziiert werden, müssen die genauen genetischen Variationen, die zur Psoriasisentstehung führen, noch identifiziert werden. Neben genetischer Prädisposition fördern bestimmte Umweltfaktoren das Auftreten psoriatischer Plaques. Außer den bekannten Triggerfaktoren wie Stress, viralen Infekten oder Lithium scheinen auch das Signalmolekül Wnt5a und Interferon-alpha eine wichtige Rolle zu spielen.

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse konnten die bereits bekannte Überexpression von Wnt5a in psoriatischer Haut bestätigen. Das Signalmolekül wurde in der Basalzellschicht der Epidermis von Psoriasispatienten lokalisiert. Die Hochregulation von Wnt5a in Keratinozyten steigerte deren Sensitivität gegenüber Interferon-alpha, außerdem induzierte Wnt5a Interferon-abhängige Zielgene wie IFI27 und IFI78. Ein Synergismus zwischen Wnt5a- und Interferon-alpha-Signaltransduktion ließ sich am Beispiel von APP und Nedd8 nachweisen. APP ist durch seine Wirkung über sAPP-alpha als bedeutender epidermaler Wachstumsfaktor besonders hinsichtlich neuer Therapieansätze bei der Psoriasis interessant.

Die beschriebenen Beobachtungen und Zusammenhänge verdeutlichen, welche bedeutende funktionelle Rolle das Signalmolekül Wnt5a bei der Psoriasis vulgaris spielt.

Wnt5a, Interferon-alpha, primäre Keratinozyten, Psoriasis vulgaris

Abstract

Psoriasis vulgaris is a complex inflammatory skin disorder involving both altered differentiation and proliferation in keratinocytes, as well as activation of immune cells. Although several genomic regions have been shown to be associated with the disease, the precise genetic variations regulating susceptibility to psoriasis have yet to be defined. Besides genetic susceptibility, environmental triggers drive disease flares. Well known factors are stress response, viral infections or lithium. Beyond these, the differentiation factor Wnt5a and interferon-alpha seem to play a prominent role during psoriasis pathogenesis.

The following results show an overexpression of Wnt5a in psoriatic skin and its localisation in the basal cell layer of the epidermis. The upregulation of Wnt5a in keratinocytes increased their sensitivity against interferon-alpha. Furthermore Wnt5a induced interferon target genes like IFI27 and IFI78. A synergism between Wnt5a and interferon-alpha signal transduction was shown for APP and Nedd8. APP signalling through sAPP-alpha which is an important epidermal growth factor, is especially interesting in terms of new therapy approaches in psoriasis.

The activation of a Wnt-interferon signalling network occurs uniformly in psoriasis and appears to be a converging point downstream of distinct genetic susceptibility subgroups.

Wnt5a, interferon-alpha, primary keratinocytes, psoriasis vulgaris

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	ZIELE DER ARBEIT.....	8
2	GRUNDLAGEN	9
2.1	STAND DER FORSCHUNG.....	9
2.2	PSORIASIS UND IFN α	10
2.3	PSORIASIS UND WNT5A.....	11
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	STANZBIOPSIEN.....	12
3.2	ZELLKULTUR.....	12
3.3	STIMULATION MIT WNT5A-PEPTID UND IFN α	13
3.4	MIKROARRAY-VERSUCHE.....	14
3.5	TRANSFEKTION MIT WNT5A-PCMV.....	14
3.6	RT-PCR UND WESTERN BLOT.....	15
3.7	IMMUNOHISTOCHEMIE.....	16
4	ERGEBNISSE	17
4.1	WNT5A IST IN KERATINOZYTEN VON PSORIASIS PATIENTEN ÜBEREXPRIMIERT....	17
4.2	WNT5A IST IN DER EPIDERMIS VON PSORIASISPATIENTEN IN SEINER VERTEILUNG VERÄNDERT.....	17
4.3	WNT5A INDUZIERT IFN α -ABHÄNGIGE ZIELGENE.....	18
4.4	WNT5A ERHÖHT DIE ZELLULÄRE SENSITIVÄT GEGENÜBER IFN α IN KERATINOZYTEN.....	20
4.5	SYNERGISTISCHE INDUKTION VON NEDD8 UND APP DURCH WNT5A UND IFN α ..	21
4.6	ERHÖHTE INDUKTION VON IFN α – ZIELGENEN IN KERATINOZYTEN VON PSORIASIS – PATIENTEN MIT ERHÖHTER WNT5A EXPRESSION.....	22
5	DISKUSSION	24
	LEBENSLAUF	33
	ERKLÄRUNG	34

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Zell-autonome Überexpression von Wnt5a bei Keratinozyten von Psoriasispatienten in vitro.....	17
Abb. 2: Veränderte Expression von Wnt5a bei Psoriasis in vivo.	18
Abb. 3: Induktion von Wnt5a Zielgenen in Keratinozyten.	20
Abb. 4: Wnt5a erhöht IFN α Sensitivität.	21
Abb. 5: Synergistische Induktion von Zielgenen nach Wnt5a und IFN α Kostimulation.	22
Abb. 6: Erhöhte Induktion von IFN α - Zielgenen in psoriatischen Keratinozyten.....	23

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Transkriptionelle Geninduktion in Keratinozyten nach Stimulation durch Wnt5a.....	19
--	----

1 Einleitung

Psoriasis vulgaris, im Volksmund auch bekannt als „Schuppenflechte“, ist eine häufige, chronisch entzündliche Hauterkrankung. Die weltweite Prävalenz der Psoriasis liegt zwischen 0,6 und 4,8 Prozent (Naldi 2004). Erste Symptome treten meist im jungen Erwachsenenalter auf und persistieren oft lebenslang (Nevitt et al. 1996). Die Krankheit verläuft in Schüben oder chronisch, mit wechselnder Lokalisation und Ausdehnung der Läsionen. Ergebnisse aus Zwillingsstudien lassen die Beteiligung einer starken genetischen Komponente bei der Entstehung der Psoriasis vermuten (Trembath et al. 1997).

Multifaktorielle Auslöser, wie mechanische, thermische und chemische Irritation oder Stress, führen bei entsprechender genetischer Prädisposition zu einer gesteigerten Proliferation der Epidermis und infolgedessen zu starker Schuppenbildung. Charakteristische Effloreszenzen sind scharf begrenzte, erythematöse, mit silberweissen Schuppen bedeckte, zuweilen juckende Herde verschiedener Größe und Gestalt, besonders an den Streckseiten der Extremitäten, behaartem Kopf und Körperfalten. Auch die Nägel können betroffen sein (Tüpfelnägel, „Ölfleck“). Histologisch finden sich typischerweise eine Hyperparakeratose mit intra- und subkornealen Munro-Mikroabszessen (Granulozytenansammlungen), vaskuläre Veränderungen, Akanthose (Verdickung des Stratum spinosum) und Papillomatose (Hypertrophie der Papillen bis ins Stratum corneum). Verschiedene, sogenannte Psoriasis-Phänomene lassen sich an psoriatischen Hautveränderungen auslösen und gelten als pathognomonisch: Beim Kratzen zerfallen die Hautschuppen in feine, weiße Partikel, die an abgeschabtes Kerzenwachs erinnern (Kerzenfleckphänomen). Darunter liegt eine dünne Epidermis, das „letzte Häutchen“, nach dessen Entfernung eine punktförmige Blutung, „blutiger Tau“, auftritt (Auspitz-Phänomen).

Psoriasispatienten leiden nicht selten an schwerem Juckreiz. In ungefähr zehn Prozent der Fälle tritt zusätzlich zu den Hautläsionen eine Arthritis auf (Godic 2004). Obwohl die Lebenserwartung von der Erkrankung nicht beeinträchtigt wird, findet man bei den Betroffenen ein verstärktes Auftreten von Depressionen, sozialem Rückzug und eine erhöhte Suizidgefährdung im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Nevitt et al. 1996). Dies spricht für eine außerordentliche psychische Belastung, der die Patienten aufgrund ihrer zum Teil erheblichen

körperlichen Entstellung, im öffentlichen und privaten Umfeld ausgesetzt sind. Als chronische Erkrankung, bei der bis heute noch keine Heilung möglich ist, verursacht die Psoriasis außerdem immense Kosten für das Gesundheitssystem. In der biomedizinischen Forschung hat sie daher schon lange einen wichtigen Stellenwert als Modell für polygenetische Erkrankungen mit komplexer Beteiligung des Immunsystems.

1.1 Ziele der Arbeit

Obwohl die Psoriasis intensiv erforscht wird und unzählige molekulare und zelluläre Veränderungen beschrieben wurden, sind die zugrundeliegenden Ursachen für die Entstehung der Krankheit bis heute weitgehend unklar. In den vergangenen Jahren lieferten die Ergebnisse unterschiedlicher Forschungsgruppen diverse direkte und indirekte Hinweise auf eine maßgebliche Beteiligung des Signalmoleküls Wnt5a an der Psoriasispathogenese. Bislang konnte eine erhebliche klinische Relevanz von Wnt5a unter anderem als Tumorsuppressorgen nachgewiesen werden (Jönsson et al. 2002). Seine Bedeutung bei der Psoriasis ist noch unklar. Desweiteren spielt Interferon-alpha ($IFN\alpha$) bei der Psoriasis eine wichtige Rolle, da es das klinische Krankheitsbild nachweisbar beeinflusst.

Vor diesem Hintergrund sucht meine Arbeit die Bedeutung von Wnt5a für die Psoriasispathogenese näher zu charakterisieren und widmet sich ebenfalls der Frage einer möglichen Interaktion zwischen Wnt5a und $IFN\alpha$.

2 Grundlagen

2.1 Stand der Forschung

Bis in die 1990er Jahre wurde eine pathologische Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten als Ursache der Psoriasis angenommen, vermutlich weil die epidermale Hyperplasie das auffälligste klinische und histologische Merkmal der Erkrankung darstellt. Neuere Erkenntnisse lassen jedoch darauf schließen, dass immunologische Faktoren bei der Psoriasisentstehung eine bedeutende Rolle spielen (Bowcock et al. 2005): Man nimmt an, dass die epidermalen Veränderungen in Folge zellulärer Immuninfiltrate in der Haut auftreten (Nickoloff et al. 2000, Vollmer et al. 2001). Mittels Immunophänotypisierung konnten klonale Populationen von CD4+ und CD8+ T-Zellen in der Dermis, sowie Neutrophile und Makrophagen in der Dermis und Epidermis nachgewiesen werden (Bos et al. 1983). Heute wird Psoriasis als T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen (Gottlieb et al. 1995). Die Klassifikation als Autoimmunerkrankung geht auf eine Reihe klinischer Studien zurück, die eine Verbesserung der Erkrankung nach Gabe von T-Zell-Antagonisten wie Cyclosporin (Tigalowna et al. 1989) oder Tacrolimus (Jegasothy et al. 1992) zeigten. Bis jetzt konnten jedoch keine autoreaktiven T-Zellen bei Psoriasispatienten nachgewiesen werden.

Das beschleunigte Wachstum und die veränderte Differenzierung von Keratinozyten in psoriatischen Plaques ist ein charakteristisches Merkmal der Wundheilung und wird als regenerative Reifung (regenerative maturation) bezeichnet (Mansbridge et al. 1987). Viele Proteine, die in der sich regenerierenden Epidermis überexprimiert sind, werden mit der genetischen Veranlagung für Psoriasis in Verbindung gebracht. Einige dieser Proteine sind chemotaktisch für Leukozyten. Letztere wandern in die Epidermis ein, wo sie Cytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF α) und INF γ freisetzen, die wiederum die Transkription von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in Keratinozyten (Banno et al. 2003, Banno et al. 2004) fördern und so die Leukozytenmigration verstärken.

Nicht-läsionale Haut von Psoriasispatienten gleicht im klinischen Erscheinungsbild der Haut gesunder Kontrollpatienten. Erst unter Einwirkung bestimmter auslösender Faktoren (Barisic-Drusko et al. 2004) wie bakterieller und viraler Infekte, Entzündungen, Einnahme immunsuppressiver Medikamente (Corticosteroide),

Verletzung der Haut (Koebner Phänomen) oder Stress, entwickeln sich die für Psoriasis typischen Läsionen. Dabei wandern zunächst mononukleare Leukozyten (T-Zellen, Monozyten, Dendritische Zellen) über dermale Blutgefäße in die Epidermis ein und lösen eine Hyperplasie der Keratinozyten aus. Die hierdurch akut auftretenden Hautläsionen entwickeln sich in den meisten Fällen zu chronischen Plaques, die ohne Therapie über Jahre persistieren können (Ragaz et al. 1979).

2.2 Psoriasis und IFN α

IFN α gehört zu den Typ1 Interferonen und spielt eine wichtige Rolle in der Psoriasispathogenese. Das Auftreten psoriatischer Plaques kann, bei Personen mit entsprechender Prädisposition, sowohl durch subkutane Injektion von IFN α , als auch durch Virusinfektionen infolge Freisetzung von endogenem Interferon getriggert werden (Downs et al. 2000, Kowalzik 1997). Außerdem sind alle IFN α -Zielgene bei Psoriasispatienten überexprimiert. Diese Beobachtungen lassen eine Veränderung der IFN-Signaltransduktion bzw. eine gesteigerte Sensitivität gegenüber IFN α bei der Psoriasis vermuten.

Die IFN α -Signaltransduktion erfolgt entweder über STAT1 / 2, über IRFs (sogenannte „interferon regulator factors“), oder über STAT3. Die Keratin 14 Promotor-gesteuerte, epidermale Überexpression von STAT3 führt bei Mäusen zu einem psoriasisähnlichen Phänotyp (Sano et al. 2005). Außerdem fördert die Aktivierung von STAT3 die Proliferation von T-Zellen und hemmt deren Apoptose (Tanabe et al. 2005). Demzufolge könnte eine gegenüber STAT1 / 2 bevorzugte Aktivierung von STAT3 durch IFN α zur Psoriasispathogenese beitragen.

Ein molekularer Mechanismus für die veränderte IFN α -Sensitivität bei der Psoriasis lässt sich anhand der Regulation von IRF2 darstellen. Der Transkriptionsfaktor IRF2 (= „IFN regulatory factor 2“) ist ein gut charakterisierter negativer Regulator der IFN α -Signaltransduktion (Taniguchi et al. 2001). IRF2-defiziente Mäuse entwickeln eine psoriasisähnliche Hautkrankheit mit Hyperproliferation der Keratinozyten und Einwanderung von Entzündungszellen in die Haut (Hida et al. 2000). Diese Symptome beruhen auf einer Überempfindlichkeit gegenüber der IFN α -Signaltransduktion, welche spezifisch auf die Haut begrenzt ist, wohingegen IRF2 ubiquitär exprimiert wird.

2.3 Psoriasis und Wnt5a

Das Signalmolekül Wnt5a stammt aus einer Familie von Glykoproteinen, die Zellproliferation und Migration regulieren (Veeman et al. 2003). Es gehört zur sogenannten nicht-kanonischen Untergruppe der Signalmoleküle vom „wingless“-Typ, das heißt die Signaltransduktion erfolgt nicht β -Catenin-vermittelt (Katoh 2005). Detaillierte Studien beschäftigen sich mit der Rolle von Wnt5a beim Haarwachstum und in der Melanomentstehung (Reddy et al. 2001, Weeraratna et al. 2002, Bachmann et al. 2005). In Microarray-Expressionsversuchen fand man eine Überexpression von Wnt5a in psoriatischen Plaques (Reischl et al. 2006). Diese und die folgenden Beobachtungen deuten auf eine wichtige Rolle von Wnt5a bei der Psoriasispathogenese hin: Wnt5a induziert IL-12 (Blumenthal et al. 2006), das bei Psoriasispatienten vermehrt ausgeschüttet wird und als eines der für die Psoriasis verantwortlichen Gene identifiziert wurde (Cargill et al. 2007). Wnt5a wird in hohem Maße von STAT3 induziert (Katoh et al. 2007) und trägt möglicherweise zu den psoriasisähnlichen Hautveränderungen bei, die bei STAT3-überexprimierenden, transgenen Mäusen beobachtet werden (Sano et al. 2005). Es spielt außerdem eine wichtige Rolle bei reaktiv proliferativen Reaktionen im Rahmen der Wundheilung (Fathke et al. 2006), ist bei der rheumatoiden Arthritis überexprimiert und induziert dort die Expression der Cytokine IL-8 und IL-15, die auch bei der Psoriasis überexprimiert sind (Rueckert et al. 2000).

Bis jetzt ist noch über keine Interaktion zwischen nicht-kanonischer Wnt5a- und $\text{IFN}\alpha$ -Signaltransduktion berichtet worden.

3 Material und Methoden

3.1 Stanzbiopsien

Die gesamte, im Folgenden dargestellte Arbeit mit Patientenmaterialien steht im Einklang mit den Regeln der Helsinki-Erklärung. Alle Biopsien wurden erst nach Aufklärung der Patienten und mit deren schriftlichem Einverständnis unter Lokalanästhesie durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme befanden sich die Patienten mit aktiver Erkrankung in stationärer Behandlung. Es wurden Stanzbiopsien von 5 mm Durchmesser läsionaler und nicht-läsionaler oder nicht-läsionaler Haut und gesunder Kontrollhaut entnommen und entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder für die Zellkultur weiterverarbeitet.

3.2 Zellkultur

Adulte epidermale Keratinozyten wurden nach dem modifizierten Protokoll von (Rheinwald et al. 1975) kultiviert: Die Stanzbiopsien wurden, nach Entfernung des subkutanen Fettgewebes, über Nacht bei 4 °C in Dispase 1 Lösung (Roche; 0.5 mg / ml in PBS gelöst) inkubiert. Die Epidermis wurde vorsichtig abgelöst, mit einem Skalpell zerkleinert und bei 37 °C in 5 ml Trypsin / EDTA Lösung (Gibco) inkubiert. Nach 10 Minuten wurden die Epidermisstücke mit einer 1 ml Pipettenspitze, von der vorher das untere Drittel abgeschnitten worden war, weiter zerkleinert und wiederum 5 bis 10 Minuten inkubiert. Sobald sich die Mehrzahl der Keratinozyten aus dem Zellverband gelöst hatte, wurde Trypsin durch Zugabe von 5 ml Keratinozytenmedium (333 ml DMEM low glucose; Gibco # 31885-049; 167 ml HAM's F12 (Sigma # N4888); 0.024 mg / ml Adenin (Sigma, A2786-5G); Pen / Strep 1:00 Verdünnung (Sigma); plus 61 µl HICE Cocktail: (100 µl 5 mg / ml Insulin; 10 µl 5 mg / ml Hydrocortison, 10 µl 100 µg / ml EGF, 2 µl 10⁻⁵ M Choleratoxin) inaktiviert. Die Zellen wurden bei 1500 rpm 10 Minuten lang abzentrifugiert, in 2 ml Keratinozytenmedium resuspendiert und auf einer 6-Well-Platte mit vorbereitetem Feederlayer, bestehend aus Mitomycin C-behandelten adulten Fibroblasten, ausplattiert. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Bei Konfluenz nach 7 bis 9 Tagen wurden die Zellen durch fraktionierte Trypsinisierung umgesetzt: Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie 5 Minuten in 2 ml Trypsin Lösung inkubiert und jede Minute unter dem Mikroskop kontrolliert. Sobald sich der Feederlayer abzulösen

begann, wurde die Trypsin Lösung inklusive der Fibroblasten abgesaugt und die Keratinozyten nochmals mit PBS gewaschen. Danach wurden sie in 3 ml Trypsin Lösung 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und abgelöst. Nach Inaktivierung der Trypsin Lösung mit 3 ml Keratinozytenmedium wurden die Zellen wie oben beschrieben abzentrifugiert, 1 : 2 gesplittet und auf neuem Feederlayer ausplattiert. Nach einer zweiten Passage 7 Tage später erfolgte erneut eine 1 : 2 Splittung. Sobald 50 % ige Konfluenz erreicht war, wurden die Experimente durchgeführt.

Herstellung des Feederlayers: Adulte Fibroblasten aus Brusthaut (von Reduktions-Operationen bei Mamma-Carcinom Patientinnen) wurden bis maximal zur zehnten Passage expandiert und bei – 80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 75 cm² Flaschen mit DMEM low Glucose, 10 % FCS, PenStrep (Gibco) ausplattiert. Am nächsten Tag wurden sie 1 : 3 gesplittet und weitere 24 Stunden inkubiert. 125 µl Mitomycin C (0,4 mg / ml in PBS, Sigma # M0503-2MG) wurde für 3 Stunden in 12,4 ml Medium zugegeben. Dann wurden die Zellen trypsinisiert und ausplattiert. Zellen aus einer zu 90 % konfluenten 75 cm² Flasche wurden auf fünf 10 cm² Petrischalen und eine 6-Well-Platte aufgeteilt.

HaCat Keratinozyten wurden in RPMI 1640 Medium mit GLUTAMAXTM-I kultiviert, dem 100 U / ml Pen / Strep (Gibco), 10 % FCS und 0,4 mM Calcium zugesetzt wurden.

3.3 Stimulation mit Wnt5a-Peptid und INF α

Formyl-MDGCEL: Die Funktion des relativ großen Wnt5a Proteins (43 kDa) kann durch das Oligopeptid Formyl-MDGCEL (Pepscan Systems, PCW-001) nachgeahmt werden (Säfholm et al. 2006). Formyl-MDGCEL, im folgenden auch als Wnt5a Peptid bezeichnet, und ein gleichlanges Kontrollpeptid mit zufällig generierter Aminosäuresequenz wurden in PBS gelöst, dabei auf eine Konzentration von 10 mM verdünnt, aliquotiert und bei – 80 °C gelagert. Die Stimulation kultivierter primärer Keratinozyten erfolgte, sobald die Zellen in einer 10 cm² Petrischale 50 % Konfluenz erreicht hatten. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 5 ml warmem PBS gewaschen und 8 ml frisches Keratinozytenmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden mit 100 µM Wnt5a-Peptid bzw. mit Kontrollpeptid gleicher Konzentration für 18 Stunden stimuliert.

INF α : Die Verdünnung und Lagerung von *INF α* (Recombinant Human Interferon Alpha A; PBL Biomedical Laboratories, # 3410) erfolgte wie oben bereits für das Wnt5a Peptid beschrieben. Die Stimulation primärer Keratinozyten wurde mit 20 ng / ml 18 Stunden lang durchgeführt. Kontrollzellen erhielten ein jeweils identisches Volumen des Vehikels (PBS). HaCat Keratinozyten wurden für jeweils 18 Stunden mit 3, 10, 30, 100 und 300 ng / ml *INF α* bzw. PBS als Kontrolle stimuliert.

3.4 Mikroarray-Versuche

Aus den Proben wurde RNA mit Hilfe des Rneasy Kits (Qiagen) isoliert. Die Reverse Transkription, Fluoreszenzmarkierung, Hybridisierung auf Piquor Skin Patho Arrays (Miltenyi Biotech), der Scan-Vorgang, sowie die Generierung von Rohdaten erfolgte durch die Charité Mikroarray in-house Service – Einrichtung (Frau Dr. Ungethüm). Die Daten-Normalisierung, sowie Filter-Analyse, Mittelwertbildung und Signifikanzberechnung erfolgte mit dem Program MS-Excel.

3.5 Transfektion mit Wnt5a-pCMV

In einer 10 cm² Petrischale wurden 5 x 10⁵ HaCat Keratinozyten in 6 ml RPMI 1640 Medium (siehe oben) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit 5 ml warmem PBS gewaschen und 6 ml warmes Advanced Medium (Gibco # 12491015) mit 2 % FCS zugegeben. Eine Stunde nach dem Mediumwechsel erfolgte die Transfektion. Hierzu wurden 40 µg Transfer Plasmid (Wnt5a-pCMV-XL4), 540 µl HEPES-Wasser und 600 µl 2 x HBS-Puffer vorsichtig gemischt und tropfenweise 60 µl CaCl₂ (2,5 M) hinzugefügt. Nach 15 bis 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und Zugabe von 3,6 µl in PBS gelöstem Chloroquine (50 mM), wurde das Gemisch tropfenweise gleichmäßig über die ausplattierten HaCat Zellen verteilt und die Zellen 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 8 ml warmes RPMI 1640 Medium ersetzt. Kontrollzellen wurden zeitgleich mit pLL3.7 Leervektor transfiziert. 12 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden Wnt5a-transfizierte Zellen und Kontrollzellen mit verschiedenen *IFN α* Konzentrationen für 18 Stunden stimuliert (ausführliche Darstellung in den Ergebnissen). Als Kontrolle erhielten die Zellen ein jeweils identisches Volumen des Vehikels (PBS).

3.6 RT-PCR und Western Blot

RT-PCR und Western Blot wurden Standardprotokollen entsprechend wie folgt durchgeführt:

Western Blot: Für die Western Blot Analysen wurden nukleare und zytoplasmatische Proteinextrakte mittels NE-PER Reagents (Pierce, # 78833) hergestellt. Die Proteinextrakte wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C gelagert. Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce, # 23225) bestimmt. Pro Geltasche wurden 20 µg Proteinextrakt geladen, auf 15 % igen Acrylamid-SDS Gelen separiert und auf Cellulose-Nitrat-Membranen (Schleicher & Schell, # 10 402 594) geblottet. Die Blots wurden 30 Minuten in 4 % fettarmer Milch in TBST (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween 20) geblockt und anschließend mit den primären und sekundären Antikörpern in 4 % fettarmer Milch in TBST wie folgt inkubiert: Nedd8 (rabbit anti-human nedd8 polyclonal purified IgG; Cell Signaling, # 2745) und APP (rabbit anti-human Amyloid β precursor protein polyclonal purified IgG; Biozol, ab12269) jeweils 1:1000 verdünnt bei 4 °C über Nacht. Sekundärer Antikörper war anti-rabbit-HRP (Amersham Biosciences, # NA934), Verdünnung 1:2000. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Entwicklung der Blots erfolgte mit dem ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham # RPN2 132).

RT-PCR: Zur RNA Extraktion wurde das NucleoSpin II extraction kit (Machery-Nagel, # 740 955) verwendet. Alle Reagenzien zur cDNA Synthese (SuperScript II Reverse Transcriptase, dNTP, RnaseOut, Oligo(dT)₁₂₋₁₈, DTT) wurden von Invitrogen bezogen. 1 U / 25 µl GoTaq DNA Polymerase (Promega, # M3001) wurde zur Amplifikation benutzt. Bei allen PCR Reaktionen betrug die Annealing Temperatur 55 °C.

PCR-Primer und Konditionen

Name	Forward Primer	Reverse Primer	Zyklenzahl
GAPDH	gtcagtgggtggacctgacct	aggggtctacatggcaactg	25
Wnt-5a	acacctttccaaacaggcc	ggattgttaaactcaactctc	30

Nedd8	ggtgttgctctgagaggag	agagaggggaagcacacagga	25
APP	cacagagagaaccaccagca	acatccgccgtaaaagaatg	25
IFI27 / ISG12	gcgggcattttaactgacat	cccacggagacagaaaggta	30
IFI78 / MX1	gtgcattgcagaaggtcaga	ttcaggagccagctgtaggt	25

3.7 Immunohistochemie

Der immunohistochemische Nachweis von Wnt5a wurde an 5 mm Stanzbiopsien läsionaler und nicht-läsionaler psoriatischer Haut, sowie gesunder Kontrollhaut durchgeführt. Die Gewebeproben wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Später wurden sie in Sucrose Lösung (Tissue-Tek, Sakura, 4583) eingebettet, im Cryostat in 4 µm dicke Sektionen geschnitten, auf Objektträger (Menzel Gläser Super Frost Plus, J1800AMNZ) aufgezogen und bei -20 °C für 10 Minuten in 100 % Aceton fixiert. Für die Färbung wurde das Universal DakoCytomation LSAB + Kit, Peroxidase (DakoCytomation, K0690) verwendet. Alle Kitreagenzien hatten vor Beginn der Färbung Raumtemperatur. Zum Löschen endogener Peroxidase-Aktivität wurden die Proben zunächst 5 Minuten in Peroxidaseblock (Dako, S2001) inkubiert und anschließend dreimal 5 Minuten mit TBS (0,05 mol / l Tris-gepufferte Kochsalzlösung) gewaschen. Wie in (Bachmann et al., 2005) beschrieben, wurden die Schnitte 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (goat anti-mouse Wnt5a antibody polyclonal purified IgG, R&D Systems, AF 645), 1:100 verdünnt (Verdünnungslösung: 0,05 mol / l TBS mit 1 % Rinderserumalbumin (BSA)), bzw. einem Kontrollantikörper (anti-goat-IgG, HRP, Santa Cruz # SC-2922) inkubiert, gefolgt von biotinyliertem Link-Antikörper und peroxidasemarkiertem Streptavidin für jeweils 30 Minuten. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde jeweils 5 mal 5 Minuten mit TBS gewaschen. Die Färbung wurde nach der Inkubation mit Substratchromogenlösung (Large Volume DAB+, DakoCytomation, K3468) abgeschlossen. Nun wurden die Schnitte 3 Minuten in Mayer's Hämatoxilin (Meditate, 41-5130-00) gegengefärbt, vorher und danach jeweils 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Glycergel Mounting Medium (DakoCytomation, C0563) eingedeckt und 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

4 Ergebnisse

4.1 Wnt5a ist in Keratinozyten von Psoriasis Patienten überexprimiert

Die bereits bekannte Überexpression von Wnt5a in psoriatischer Haut in vivo konnte, mittels Western Blot, auch bei kultivierten Keratinozyten in vitro gezeigt werden. Hierzu wurden Keratinozyten aus nicht-läsionaler Haut von Psoriasispatienten oder aus gesunder Kontrollhaut isoliert, 14 Tage kultiviert und anschließend Zytoplasmaextrakte hergestellt, wie in Material und Methoden detailliert beschrieben. Im Western Blot zeigten die WNT5a Proteinbanden (43 kDa) signifikante Dichteunterschiede, welche die relative Überexpression von Wnt5a in psoriatischer Haut gegenüber gesunder Kontrollhaut belegten (Abb. 1). Die Zahlen in der unteren Reihe der Abbildung bezeichnen die densitometrisch quantifizierte Färbungsintensität (% der mittleren Ponceau S Intensität).

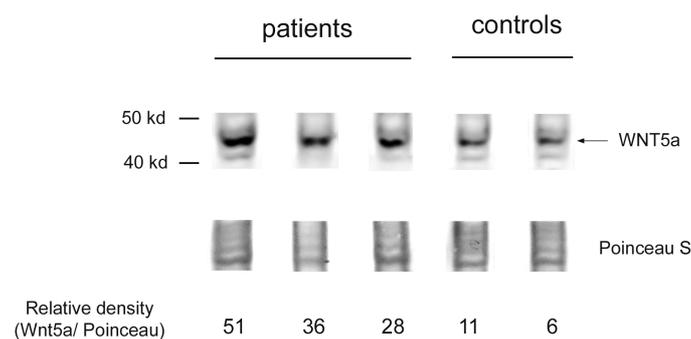


Abb. 1: Zell-autonome Überexpression von Wnt5a bei Keratinozyten von Psoriasispatienten in vitro.

Western blot von Wnt5a Protein in Zytoplasmaextrakten von Keratinozyten, die 14 Tage in vitro kultiviert wurden. (Keratinozyten von Psoriasispatienten wurden aus nicht-läsionaler Haut isoliert. Die Zahlen in der unteren Reihe bezeichnen die densitometrisch quantifizierte Färbungsintensität (% der mittleren Ponceau S Intensität).

4.2 Wnt5a ist in der Epidermis von Psoriasispatienten in seiner Verteilung verändert

Um die Lokalisation von Wnt5a in der Epidermis herauszufinden, wurden 4 µm Cryoschnitte aus Stanzbiopsien läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Psoriasispatienten (n = 2) angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Nach Inkubation mit Wnt5a Antikörper zeigte sich in der Basalzellschicht sowohl läsionaler,

als auch nicht-läsionaler Psoriasis-Haut ein verändertes Verteilungsmuster von Wnt5a mit verstärkter Expression gegenüber gesunder Kontrollhaut (Abb. 2). Wie erwartet ist Wnt5a auch in der äußeren Wurzelschicht des Haarfollikels (mittleres Bild, unten links) nachweisbar, was für die Spezifität des Antikörpers spricht.

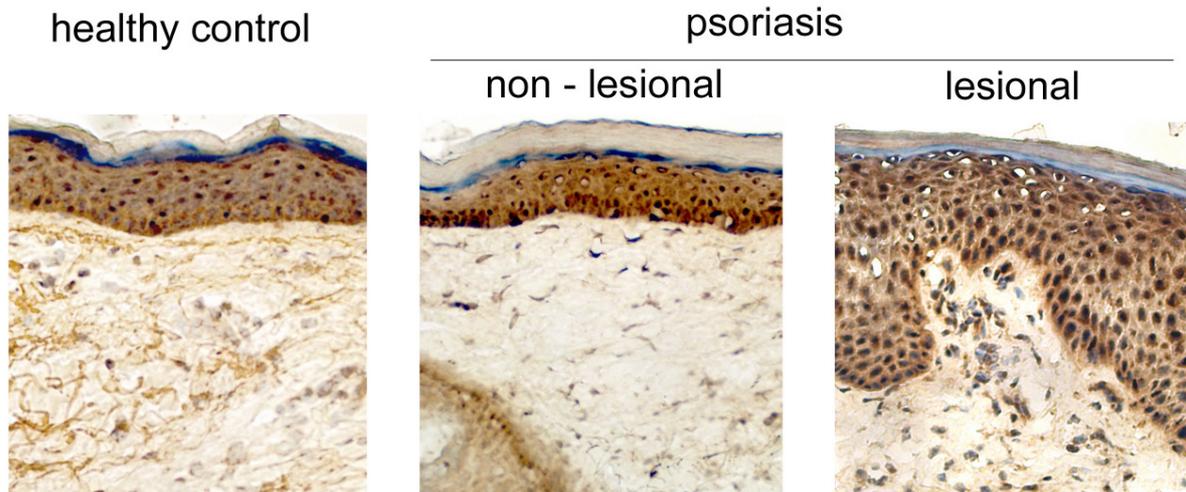


Abb. 2: Veränderte Expression von Wnt5a bei Psoriasis in vivo.
 Representative Ausschnitte von Hautschnitten nach Inkubation mit anti-Wnt5a Antikörper. Beachtenswert ist die Nachweisbarkeit von Wnt5a in der äußeren Wurzelschicht des Haarfollikels im mittleren Bild, die das erwartete Expressionsmuster bestätigt.

4.3 Wnt5a induziert IFN α -abhängige Zielgene

Primäre Keratinozyten aus gesunder Kontrollhaut (n = 3) oder nicht-läsionaler Haut von Psoriasispatienten (n = 3) wurden für 48 Stunden mit 100 μ M Wnt5a Peptid oder irrelevantem Kontrollpeptid stimuliert, wie in Material und Methoden beschrieben. Nach Extraktion der RNA wurde die globale Genexpression mittels Piquor Skin-Patho Microarray Analyse ermittelt. Tabelle 1 stellt diejenigen Transkripte aller Gene (n = 1146) dar, welche nach Stimulation mit Wnt5a Peptid mindestens 1,2-fach hochreguliert waren. Dazu zählten die Gene Nedd8 und APP, die in psoriatischer Haut 1,3- bzw. 1,4-fach überexprimiert waren, im Gegensatz zu einer lediglich 1,4- bzw. 1,1-fachen Überexpression nach Wnt5a-Stimulation in gesunder Kontrollhaut. Unerwartet stellte sich zudem heraus, dass Wnt5a die Expression von IFN α Zielgenen wie IFI27 (MX1) und IFI78 induziert (1,5-fache Hochregulation in

psoriatischer Haut gegenüber 1,1- bzw. 1,2-fach bei gesunden Kontrollen), welche bekanntermaßen bei der Psoriasis deutlich überexprimiert sind.

Tabelle 1: Transkriptionelle Geninduktion in Keratinozyten nach Stimulation durch Wnt5a.

Primäre Keratinozyten aus gesunder Kontrollhaut (n = 3) oder gesunder Haut von Psoriasispatienten (n = 3) wurden jeweils mit Wnt5a – Peptid oder irrelevantem Kontroll-Peptid stimuliert. Anschließend wurde RNA präpariert und die globale Genexpression mittels Piquor Skin-Patho Microarray Analyse ermittelt. Die Tabelle stellt diejenigen Transkripte aller Gene (n = 1146) dar, welche mindestens 1,2-fach hochreguliert waren.

Gen Symbol	Kontrollen	Psoriasis	Gesamt	T-Test gesamt
NEDD8:	1.35 ± 0.12	1.34 ± 0.08	1.3 ± 0.09	0,0000
IFI78 (MX1)	1.16 ± 0.26	1.53 ± 0.84	1.35 ± 0.59	0,1418
IFI27	1.12 ± 0.14	1.52 ± 0.78	1.32 ± 0.55	0,1070
APP	1.14 ± 0.07	1.41 ± 0.32	1.28 ± 0.25	0,0025

RNA Proben aus dem im oberen Abschnitt dargelegten Versuch wurden in cDNA umgeschrieben und die Expression der gezeigten Gene mittels RT-PCR untersucht (Abb. 3). Hierdurch ließen sich die Resultate der Microarray Analysen größtenteils bestätigen. Besonders bei den Psoriasisproben zeigte sich bei allen drei Patienten nach Wnt5a Stimulation eine deutliche Überexpression von APP, IFI27 und IFI78. Eine Überexpression von Nedd8 ließ sich nur bei zwei von drei Patienten nachweisen. In der Kontrollgruppe waren die Stimulationseffekte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Microarray Analysen, deutlich schwächer ausgeprägt. Teilweise waren jedoch keine eindeutigen oder sogar gegenteilige Effekte zu erkennen, wie z.B. die Herunterregulation von Nedd8 nach Wnt5a Stimulation bei einem der drei Probenpaare. Ein anderes Probenpaar zeigte den gleichen gegenteiligen Effekt für IFI78. Bei allen PCR Versuchen dienten die GAPDH Banden in der letzten Zeile als Indikator dafür, dass bei allen Proben die gleiche cDNA Menge eingesetzt wurde.

Wegen dieser zum Teil je nach Proband divergierenden Ergebnisse wurde ein weiteres Experiment durchgeführt: HaCat Keratinozyten wurden transient mit Wnt5a cDNA oder Kontrollvektor transfiziert und anschließend die Expression der oben beschriebenen Gene mittels RT-PCR durchgeführt. Als Nachweis einer erfolgreichen Transfektion war Wnt5a gegenüber der mit Leervektor transfizierten Kontrollprobe stark überexprimiert. Wie erwartet ließ sich bei allen vier untersuchten Genen eine Hochregulation erkennen.

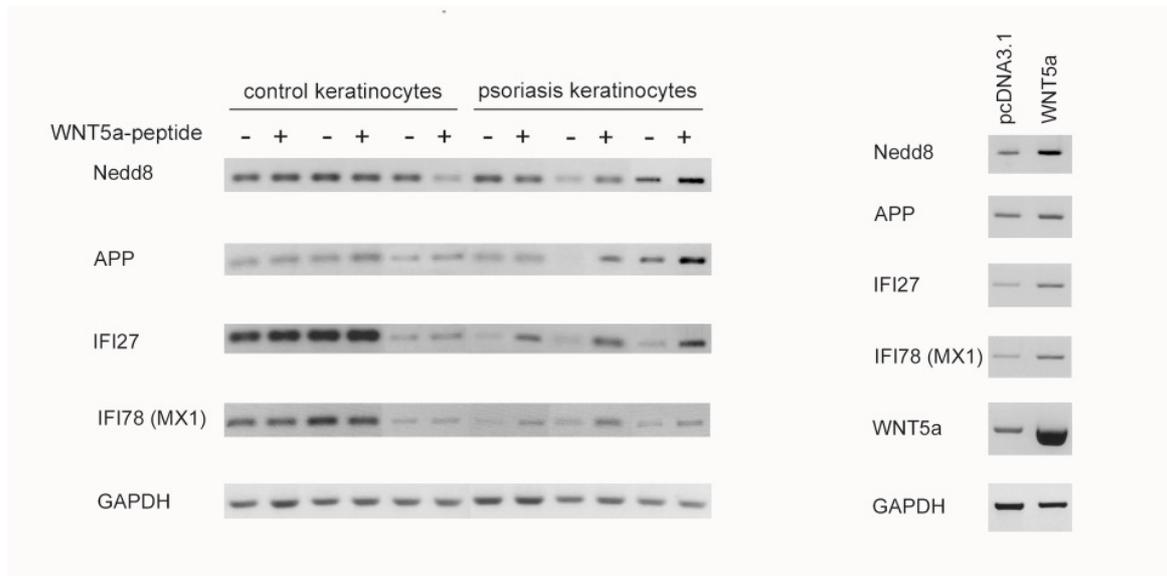


Abb. 3: Induktion von Wnt5a Zielgenen in Keratinozyten.

Primäre Keratinozyten von Kontrollprobanden oder Psoriasispatienten wurden *in vitro* für 14 Tage expandiert und anschließend mit Wnt5a-Peptid (links, markiert „+“) bzw. Kontroll-Peptid („-“) stimuliert. Die Expression der gezeigten Gene wurde mittels RT-PCR durchgeführt. (Rechts:) HaCat Keratinozyten wurden mit Wnt5a-cDNA oder Kontrollvektor transfiziert und anschließend die Expression der gezeigten Gene mittels RT-PCR durchgeführt.

4.4 Wnt5a erhöht die zelluläre Sensitivität gegenüber IFN α in Keratinozyten.

Um den Effekt von Wnt5a auf die IFN α Signaltransduktion näher zu analysieren, wurde die Dosisabhängigkeit der Induktion von Zielgenen durch IFN α untersucht. Nach Transfektion von HaCat Keratinozyten mit Wnt5a cDNA oder Kontrollvektor und anschließender IFN α Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von 3 bis 300 ng / ml, wurde mittels RT-PCR die Expression des IFN α Zielgens IFI27 (MX1) ermittelt und densitometrisch quantifiziert. Die errechneten mittleren EC 50 Werte waren 6 ng / ml in Anwesenheit, und 22 ng / ml in Abwesenheit von Wnt5a, was auf

einen signifikanten Anstieg der IFN α Sensitivität in Anwesenheit von Wnt5a hindeutet.

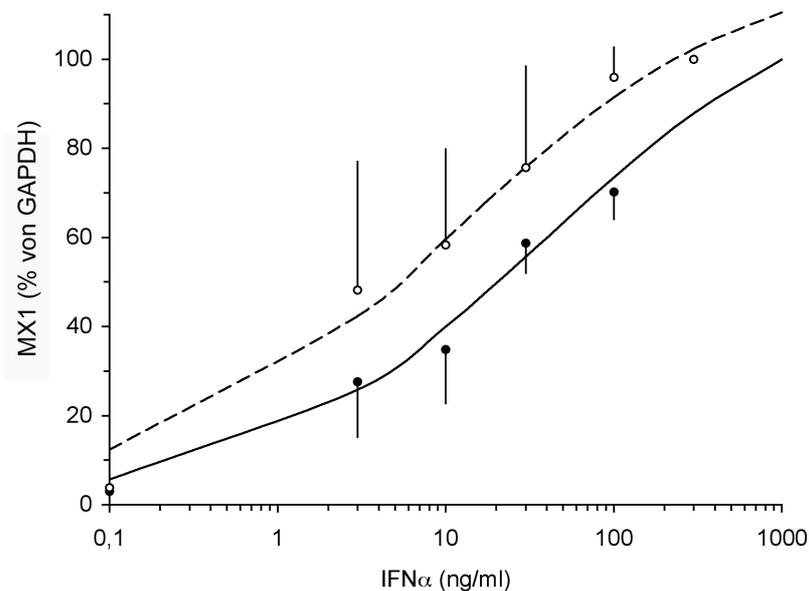


Abb. 4: Wnt5a erhöht IFN α Sensitivität.

HaCat Keratinozyten wurden, wie bei Abb. 3 beschrieben, mit Wnt5a-cDNA (leere Symbole) oder Kontrollvektor (gefüllte Symbole) transfiziert und anschließend mit IFN α in den angegebenen Dosierungen stimuliert. Die Expression des Zielgens IFI27 (MX1) wurde mittels RT-PCR ermittelt und densitometrisch quantifiziert. Die errechneten mittleren EC₅₀ Werte waren 6ng/ml in Anwesenheit, und 22ng/ml in Abwesenheit von Wnt5a, was auf einen signifikanten Anstieg der IFN α Sensitivität in Anwesenheit von Wnt5a hindeutet. Die gezeigten Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

4.5 Synergistische Induktion von Nedd8 und APP durch Wnt5a und IFN α

Die bisherigen Ergebnisse führten zu der Frage, ob die gleichzeitige Stimulation von Zellen mit Wnt5a und IFN α eine verstärkte Expression von Zielgenen auslösen würde, verglichen mit dem Effekt bei alleiniger Zugabe eines der beiden Signalmoleküle. Hierzu wurden HaCat Keratinozyten entweder nur mit Wnt5a-cDNA transfiziert, oder anschließend zusätzlich 18 Stunden mit 20 ng / ml IFN α stimuliert, oder es wurde IFN α zu mit Leervektor transfizierten Zellen gegeben. Nach RNA Extraktion und cDNA Synthese wurde die Expression von APP mittels RT-PCR bestimmt (Abb. 5a). Die Ergebnisse bestätigten die Hypothese einer synergistischen Induktion von APP durch Wnt5a und IFN α . Daraufhin wurde derselbe Versuch wiederholt und Cytoplasmaextrakte für die Western Blot Analyse gewonnen (Abb.

5b). Auch auf Proteinebene zeigte sich sowohl bei APP, als auch indirekt bei Nedd8 (in Form neddylierter Proteine in Höhe von 50 und 80 kDa), eine deutlich erhöhte Expression nach Stimulation mit beiden Signalmolekülen.

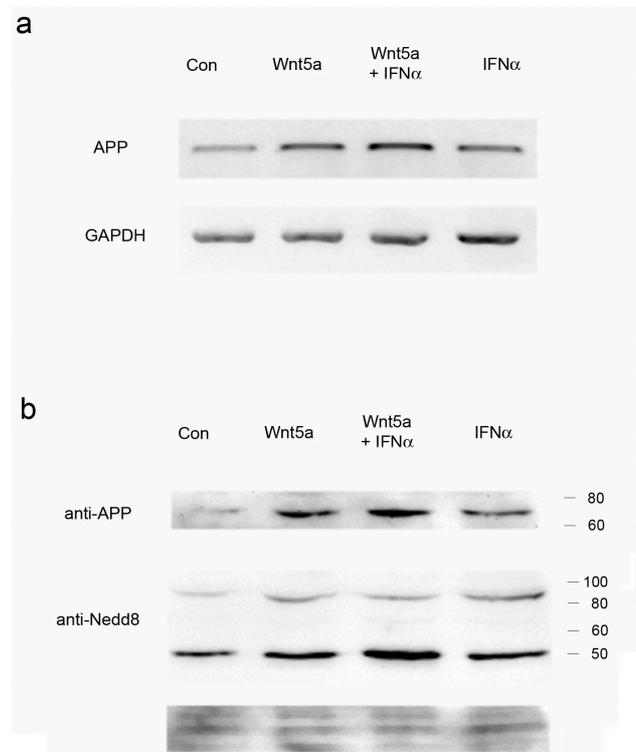


Abb. 5: Synergistische Induktion von Zielgenen nach Wnt5a und IFN α Kostimulation.

HaCat Keratinozyten wurden entweder nur mit Wnt5a-cDNA transfiziert, oder anschließend zusätzlich mit IFN α stimuliert, oder es wurde IFN α zu mit Leervektor transfizierten Zellen gegeben. Anschließend wurde die Expression von APP mittels RT-PCR bestimmt (a) bzw., nach Wiederholung des Versuchs, Cytoplasmaextrakte für die Western Blot Analyse gewonnen (b). Sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene zeigte sich bei APP und indirekt bei Nedd8, eine signifikant erhöhte Expression nach gemeinsamer Stimulation mit beiden Signalmolekülen. Zur Darstellung gelangen sog. c-terminales APP Fragment sowie Nedd8-konjugierte Proteine bei ca. 50 kDa und 90 kDa. Am unteren Rand dargestellt die Ponceau-S Färbung des verwendeten Blots, welche eine vergleichbare Menge Protein in allen Spuren bestätigt.

4.6 Erhöhte Induktion von IFN α – Zielgenen in Keratinozyten von Psoriasis – Patienten mit erhöhter Wnt5a Expression.

Keratinozyten von nicht-läsionaler psoriatischer Haut oder gesunder Kontrollhaut wurden in vitro für 14 Tage expandiert und 18 Stunden mit 20 ng / ml IFN α stimuliert. Die globale Genexpression wurde mittels Piquor Skin-Patho Microarray Analyse ermittelt. Das Diagramm zeigt die Stärke der Induktion (IFN α gegen basale

Expression) aller Gene auf dem Array (41 von 1133), die nach $\text{INF}\alpha$ Stimulation der Keratinozyten von Kontrollprobanden (entlang der x – Achse, n = 4) und Psoriasispatienten (entlang der y – Achse, n = 3) eine mindestens zweifach erhöhte Expression zeigten. Punkte repräsentieren Mittelwerte, horizontale Linien repräsentieren Standardabweichungen innerhalb der Kontrollprobanden, vertikale Linien repräsentieren Standardabweichungen innerhalb der Psoriasispatienten. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den theoretischen Verlauf bei gleichstarker Stimulation. Alle Gene sind in höherem Maße in Keratinozyten von Psoriasispatienten induziert, entsprechend einer mittleren relativen 1.8 (± 1.1)-fachen Überinduktion (Stärke der Induktion bei Patienten gegen Stärke der Induktion bei Kontrollen) aller $\text{INF}\alpha$ induzierbaren Gene ($p = 0.0013$ in einem einseitigen gepaarten T-Test)

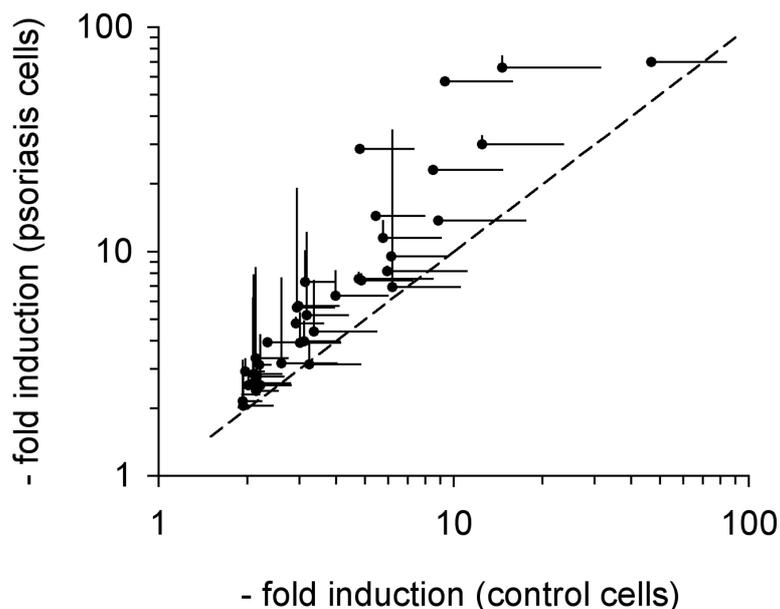


Abb. 6: Erhöhte Induktion von $\text{INF}\alpha$ - Zielgenen in psoriatischen Keratinozyten.

Das Diagramm zeigt die Stärke der Induktion ($\text{INF}\alpha$ gegen basale Expression) aller Gene auf dem Array (41 von 1133), die nach $\text{INF}\alpha$ Stimulation der Keratinozyten von Kontrollprobanden (entlang der x – Achse, n = 4) und Psoriasispatienten (entlang der y – Achse, n = 3) eine mindestens zweifach erhöhte Expression zeigten. Punkte repräsentieren Mittelwerte, horizontale Linien repräsentieren Standardabweichungen innerhalb der Kontrollprobanden, vertikale Linien repräsentieren Standardabweichungen innerhalb der Psoriasispatienten. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den theoretischen Verlauf bei gleichstarker Stimulation.

5 Diskussion

In Microarray-Expressionsversuchen fand man vor kurzem eine Überexpression von Wnt5a in psoriatischen Plaques (Reischl et al. 2006, Zhou et al. 2003). Obwohl bereits lange als wichtiges Signalmolekül beim Haarwachstum und in der Melanomentstehung bekannt (Reddy et al. 2001, Weeraratna et al. 2002, Bachmann et al. 2005), war Wnt5a bis dahin noch nicht mit der Psoriasispathogenese in Zusammenhang gebracht worden. Welche funktionelle Rolle es hierbei spielt, ist bis jetzt weitgehend unklar. Die nachfolgend diskutierten Beobachtungen ermöglichen einen ersten Einblick in die komplexen Zusammenhänge der Wnt5a Signaltransduktion. Allerdings sind sie aufgrund der geringen Anzahl verwendeter Proben nur begrenzt aussagekräftig, können jedoch als Wegweiser für weitere, umfangreichere Experimente dienen.

Die bekannte Hochregulation von Wnt5a in psoriatischer Haut in vivo kann mittels Western Blot auch in kultivierten Keratinozyten gezeigt werden (Abb. 1). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob auch in vitro in Keratinozyten von Psoriasispatienten Wnt5a per se, d.h. „zell-autonom“, auch ohne biologischen Kontext, überexprimiert ist. Das wäre ein „zelltyp-spezifischer“ Phänotyp. Diese Schlußfolgerung bedarf aber einer Wiederholung des Versuches mit deutlich höherer Probenzahl. In immunhistochemischen Schnitten wird Wnt5a erstmalig in der Basalzellschicht der Epidermis lokalisiert und ist auch hier sowohl in läsionaler, als auch in nicht-läsionaler Psoriasis Haut gegenüber gesunder Kontrollhaut verstärkt exprimiert (Abb. 2). Wnt5a ist erwartungsgemäß ebenfalls in der äußeren Wurzelschicht von Haarfollikeln nachweisbar, wo es Proliferation und Motilität der Epithelzellen während der anagenen Wachstumsphase kontrolliert (Reddy et al. 2001). Eine ähnliche Funktion des Signalmoleküls ist auch für die Basalzellschicht der Epidermis anzunehmen.

Stimulation mit Wnt5a Peptid (Formyl-MDGCEL) ruft in psoriatischer Haut eine stärkere Überexpression von APP, IFI27, IFI78 und Nedd8 hervor, als in gesunder Kontrollhaut (Tabelle 1). Dieser Effekt ist jedoch nicht bei allen Probenpaaren eindeutig nachweisbar (Abb. 3 links). Die Transfektion von HaCat Keratinozyten mit Wnt5a-cDNA bestätigt die in primären Keratinozyten gemachte Beobachtung und lässt darüber hinaus eine weitaus deutlichere Hochregulation aller vier

beschriebenen Gene erkennen (Abb. 3 rechts). Neueste Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Funktion von endogenem Wnt5a Protein wesentlich von seiner post-translationalen Modifikation im Sinne einer Palmytylierung und Glykosylierung abhängig ist (Kurayoshi et al. 2007). Bei fehlender Palmytylierung ist eine Signalwirkung von Wnt5a an der Zelloberfläche, z.B. über Frizzled 5 Rezeptoren, nicht möglich und auch intrazelluläre Signalkaskaden können nicht aktiviert werden. Glykosylierung ist für die Sekretion von Wnt5a Protein notwendig. Die Wirksamkeit des Hexapeptidliganden Formyl-MDGCEL beruht auf der Formylierung (Anhängen einer Aldehydgruppe: - CHO) der N-terminalen Aminosäure Methionin (Säfholm et al. 2006) und ermöglicht erwiesenermaßen eine Signaltransduktion über Frizzled 5. Die angeführten Unterschiede in der Peptidstruktur und -modifikation stellen eine mögliche Erklärung für die beobachtete schwächere Wirkung des Wnt5a Peptids gegenüber dem, nach cDNA Transfektion generierten, endogenen Wnt5a Protein dar. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch unklar.

IFN α ist schon lange als potenter Triggerfaktor bei der Psoriasisentstehung bekannt (Funk et al. 1991). Dieses Cytokin wird von dendritischen Zellen ausgeschüttet, die bei Psoriasispatienten zu Krankheitsbeginn verstärkt in die Dermis einwandern (Nestle et al. 2005). Die Beobachtung, dass Wnt5a Interferon-abhängige Zielgene wie IFI27 und IFI78 induziert (Tabelle 1), lässt auf eine Verbindung zwischen beiden Signaltransduktionswegen schließen.

Die Induktion von Zielgenen durch IFN α ist dosisabhängig, wie am Beispiel von IFI27 (MX1) gezeigt wird (Abb. 4). Wnt5a und IFN α wirken synergistisch: Auf Proteinebene (Abb. 5b) zeigt sich sowohl bei APP, als auch indirekt bei Nedd8, eine deutlich erhöhte Expression nach Stimulation mit beiden Signalmolekülen. Außerdem ist die Mehrheit der IFN α induzierten Zielgene in kultivierten Keratinozyten von Psoriasispatienten, die Wnt5a in vitro ungefähr 1,8-fach überexprimieren, einheitlich erhöht, verglichen mit Zellen aus gesunder Kontrollhaut (Abb. 6). Demzufolge besteht bei Anwesenheit von Wnt5a eine funktionelle Hypersensitivität gegenüber IFN α . Es ist bekannt, dass sowohl Wnt5a (Veeman et al. 2003), als auch IFN α (Pfeffer et al. 1991, Jin et al. 2006) PKC (Protein Kinase C) aktivieren, die beim sogenannten nicht-kanonischen Wnt Signalweg (siehe unten) eine wichtige Rolle spielt. Dies wäre ein Erklärungsansatz für die synergistische Wirkung der beiden Moleküle. Um den Mechanismus der Wnt5a vermittelten Induktion von IFN α Zielgenen näher zu

analysieren, müsste in Folgeversuchen das Ausmaß der IFI27 Expression in HaCat Zellen nach Stimulation mit Wnt5a-Peptid in Abwesenheit oder Anwesenheit von Cyclohexamid, sowie nach Knock-down von Bestandteilen der Wnt5a Signalkaskade (Frizzled 5, β -Catenin, Proteinkinase C) bestimmt werden.

In Microarray Expressionsversuchen lässt sich eine Induktion von APP und Nedd8 nach Stimulation mit Wnt5a Peptid nachweisen. Die Bedeutung dieser beiden Moleküle für die Psoriasis wird im folgenden näher erläutert:

Das Membranprotein APP (= „amyloid precursor protein“) findet besonders in der Hirnforschung Beachtung, da seine Prozessierung zur Entstehung von β -Amyloid, einem Bestandteil seniler Plaques bei Morbus Alzheimer, führt. Weitere Beobachtungen zeigen eine APP Überexpression nach Entzündungen und viralen Infekten, was die beobachtete Triggerung der APP Freisetzung durch $\text{IFN}\alpha$ (Abb. 5b) plausibel erscheinen lässt. Als Zelloberflächenrezeptor auf Monozyten ermöglicht APP deren Adhäsion an Gefäßendothel und die anschließende Migration ins Gewebe (Vehmas et al. 2004). Diese Beobachtungen deuten bereits auf eine Beteiligung von APP an der Psoriasis, als entzündliche Erkrankung mit Infiltration von Monozyten in die Epidermis, hin. Keratinozyten wiederum synthetisieren drei APP Isoformen, aus denen, nach proteolytischer Spaltung durch das Enzym α -Sekretase, das Signalmolekül $\text{sAPP}\alpha$ entsteht. $\text{sAPP}\alpha$ ist ein bedeutender epidermaler Wachstumsfaktor, der u. a. die Proliferation und Migration von Keratinozyten stimuliert (Siemes et al. 2004). Wie Wnt5a wird auch APP bei der Wundheilung verstärkt exprimiert und führt über $\text{sAPP}\alpha$ zu erhöhter Keratinozytenproliferation (Kummer et al. 2002). Hemmung der α -Sekretaseaktivität reduziert die Keratinozytenproliferationsrate um 50 – 60 % und normalisiert bei psoriatischen Keratinozyten das Wachstum (Siemes et al. 2004). Diese Beobachtung macht die Signaltransduktion über APP besonders hinsichtlich neuer Therapieansätze bei der Psoriasis interessant.

Nedd8 (=„neural precursor cell-expressed developmentally downregulated protein 8“) gehört zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine. Als Neddylierung bezeichnet man die kovalente Bindung von Nedd8 an bestimmte Zielproteine. Nach Stimulation mit Wnt5a bzw. $\text{IFN}\alpha$ wurde hier eine gesteigerte Expression zweier neddylierter Proteine in Höhe von 50 und 80 kDa beobachtet (Abb 5b). Nedd8 wirkt über p63 anti-

apoptotisch (Yang et al. 1998). Außerdem scheint die Neddylierung von Cul-1, das zur Familie der SCF (Skp1, Cul-1, F-box) Proteine gehört, bei Mäusen an der Regulation des Abbaus von β -Catenin (Tateishi et al. 2001) beteiligt zu sein und diesen zu fördern. β -Catenin spielt eine Schlüsselrolle beim kanonischen Wnt-Signalweg, welcher überwiegend durch Wnt3a induziert wird: Die Bindung von Wnt an Frizzled-Rezeptoren führt zur Hemmung der GSK3 β -vermittelten Phosphorylierung von β -Catenin, das sich im Cytosol ansammelt und in den Nukleus transloziert, wo es an TCF / LEF Transkriptionsfaktoren (T-cell factor / lymphoid enhancer factor) bindet und die Expression von Zielgenen aktiviert (Kioussi et al. 2002). Wnt5a induziert dagegen hauptsächlich den nicht-kanonischen Wnt Signalweg und führt außerdem durch Herunterregulation der β -Catenin vermittelten Genexpression über TCF / LEF zur Hemmung des kanonischen Wnt Signalwegs (Mikels et al. 2006). Es wäre denkbar, dass diese Hemmung nach Induktion von Nedd8 durch Wnt5a (Abb 5b) und darauf folgende Abnahme der β -Catenin Konzentration im Cytosol noch verstärkt wird. Bei der nicht-kanonischen Wnt Signaltransduktion (Veeman et al. 2003) stimuliert Wnt5a über Frizzled Rezeptoren die intrazelluläre Calciumfreisetzung und aktiviert dadurch G-Protein gekoppelt zwei Kinasen, CamKII und PKC (Protein Kinase C), die in der Zelle komplexe Reaktionen auslösen.

Die beschriebenen Beobachtungen und Zusammenhänge verdeutlichen, welche bedeutende funktionelle Rolle das Signalmolekül Wnt5a bei der Psoriasis vulgaris spielt. Um die komplexen Mechanismen zur Steuerung dieses Signaltransduktionsnetzwerkes vollständig verstehen und letztendlich zur Entwicklung neuer Therapiestrategien nutzen zu können, muss jedoch noch intensive Forschungsarbeit geleistet werden.

Literaturverzeichnis

- Bachmann et al. 2005 Bachmann IM, Straume O, Puntervoll HE, et al.: Importance of P-Cadherin, β -Catenin, and Wnt5a / Frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma . Clin Cancer Res. 2005, 11, S.8606-8614 ,
- Banno et al. 2004 Banno T, Gazel A and Blumenberg M: Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF α) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. J Biol Chem. 2004, 279, S.32633-32642,
- Banno et al. 2003 Banno T, Adachi M, Mukkamala L, et al.: Unique keratinocyte-specific effects of interferon- γ that protect skin from viruses, identified using transcriptional profiling. Antivir Ther. 2003, 8, S.541-554,
- Barisic-Drusko et al. 2004 Barisic-Drusko V and Rucevic I: Trigger factors in childhood psoriasis and vitiligo. Coll Antropol. 2004, 28, S.277-285,
- Blumenthal et al. 2006 Blumenthal A, Ehlers S, Lauber J, et al.: The wingless homolog Wnt5a and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. Blood. 2006, 108, S.965-973,
- Bos et al. 1983 Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, et al.: Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. Arch Dermatol Res. 1983, 275, S.181-189,
- Bowcock et al. 2005 Bowcock AM and Krueger JG: Getting under the skin: The immunogenetics of Psoriasis. Nature. 2005, 5, S.699-711,
- Cargill et al. 2007 Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al.: A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. Am J Hum Gen. 2007, 80, S.273-290,
- Downs et al. 2000 Downs AM and Dunnill MG: Exacerbation of psoriasis by interferon- α therapy for hepatitis C. Clin Exp Dermatol. 2000, 25, S.351-352,
- Fathke et al. 2006 Fathke C, Wilson L, Shah K, et al.: Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. BMC Cell Biol. 2006, 7, S.4,

- Funk et al. 1991 Funk J, Langeland T, Schrupf E, et al.: Psoriasis induced by interferon- α . *Br J Dermatol.* 1991, *125*, S.463-465,
- Godic 2004 Godic A: New approaches to psoriasis treatment. A review. *Acta Dermatoven APA.* 2004, *13*, S.50-56,
- Gottlieb et al. 1995 Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, et al.: Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nature Med.* 1995, *1*, S.442-447,
- Hida et al. 2000 Hida S, Ogasawara K, Sato K, et al.: CD8 (+) T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon- α / β signaling. *Immunity.* 2000, *13*, S.643-655,
- Jegasothy et al. 1992 Jegasothy BV, Ackermann CD, Todo S, et al.: Tacrolimus (FK 506) - a new therapeutic agent for severe recalcitrant psoriasis. *Arch Dermatol.* 1992, *128*, S.781-785,
- Jin et al. 2006 Jin E-J, Park J-H, Lee S-Y, et al.: Wnt5a is involved in TGF- β 3-stimulated chondrogenic differentiation of chick wing bud mesenchymal cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006, *38*, S.183-195,
- Jönsson et al. 2002 Jönsson M, Dejmek J, Bendahl PO, et al.: Loss of Wnt5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res.* 2002, *62*, S.409-416,
- Katoh 2005 Katoh M: Wnt / PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep.* 2005, *14*, S.1583-1588,
- Katoh et al. 2007 Katoh M and Katoh M: STAT3-induced Wnt5a signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (review). *Int J Mol Med.* 2007, *19*, S.273-278,
- Kioussi et al. 2002 Kioussi C, Briata P, Baek S, et al.: Identification of a Wnt / DVI / b-Catenin-Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell.* 2002, *111*, S.673-685,

- Kowalzik 1997 Kowalzik L: Psoriasis flare caused by recombinant interferon- β injections. *J Am Acad Dermatol.* 1997, *36*, S.501,
- Kummer et al. 2002 Kummer C, Wehner S, Quast T, et al.: Expression and potential function of β -Amyloid Precursor Proteins during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res.* 2002, *280*, S.222-232,
- Kurayoshi et al. 2007 Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi M, et al.: Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt5a are necessary for its signalling. *Biochem J.* 2007, *402*, S.3,
- Mansbridge et al. 1987 Mansbridge JN and Knapp M: Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J Invest Dermatol.* 1987, *89*, S.253-263,
- Mikels et al. 2006 Mikels AJ and Nusse R: Wnts as ligands: processing, secretion and reception (review). *Oncogene.* 2006, *25*, S.7461-7468,
- Naldi 2004 Naldi L: Epidemiology of Psoriasis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004, *3*, S.121,
- Nestle et al. 2005 Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, et al.: Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *JEM.* 2005, *202*, S.135-143,
- Nevitt et al. 1996 Nevitt GJ and Hutchinson PE: Psoriasis in the community: prevalence, severity and patient's beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol.* 1996, *135*, S.533,
- Nickoloff et al. 2000 Nickoloff BJ, Bonish B, Huang BB, et al.: Characterization of a T cell line bearing natural killer receptors and capable of creating psoriasis in a SCID mouse model system. *J Dermatol Sci.* 2000, *24*, S.212-225,
- Pfeffer et al. 1991 Pfeffer LM and Colamonici OR: Transmembran signalling by interferon- α . *Pharmacology and Therapeutics.* 1991, *52*, S.149-157,
- Ragaz et al. 1979 Ragaz A and Ackermann AB: Evolution, maturation and regression of lesions of psoriasis. New observations and correlation of clinical and histologic findings. *Am J Dermatopathol.* 1979, *1*, S.199-214,

- Reddy et al. 2001 Reddy S, Andl T, Lu MM, et al.: Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech Dev.* 2001, *107*, S.69-82,
- Reischl et al. 2006 Reischl J, Schwenke S, Beekman JM, et al.: Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques. *J Invest Dermatol.* 2006, *127*, S.163-169,
- Rheinwald et al. 1975 Rheinwald JG and Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975, *6*, S.331-343,
- Rueckert et al. 2000 Rueckert R, Asadullah K, Seifert M, et al.: Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis?. *J Immunol.* 2000, *165*, S.2240-2250,
- Säfhholm et al. 2006 Säfhholm A, Leandersson K, Dejmek J, et al.: A formylated hexapeptide ligand mimics the ability of Wnt5a to impair migration of human breast epithelial cells. *J Biol Chem.* 2006, *281*, S.2740-2749,
- Sano et al. 2005 Sano S, Chan KS, Carbajal S, et al.: Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med.* 2005, *11*, S.43-49,
- Siemes et al. 2004 Siemes C, Quast T, Klein E, et al.: Normalized proliferation of normal and psoriatic keratinocytes by suppression of sAPP α -release. *J Invest Dermatol.* 2004, *123*, S.556-563,
- Tanabe et al. 2005 Tanabe Y, Nishibori T, Su L, et al.: Cutting edge: Role of STAT1, STAT3 and STAT5 in IFN- α / β responses in T lymphocytes. *J Immunol.* 2005, *174*, S.609-613,
- Taniguchi et al. 2001 Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, et al.: IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol.* 2001, *19*, S.623-655,

- Tateishi et al. 2001 Tateishi K, Omata M, Tanaka K, et al.: The Nedd8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J Cell Biol.* 2001, *155*, S.571-580,
- Tigaltonowa et al. 1989 Tigaltonowa M, Bjerke JR, Gallati H, et al.: Immunological changes following treatment of psoriasis with Cyclosporin. *Acta Derm Venerol Suppl (Stockh.)*. 1989, *146*, S.142-145,
- Trembath et al. 1997 Trembath RC, Clough RL, Rosbotham AL, et al.: Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet.* 1997, *6*, S.813,
- Veeman et al. 2003 Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT, et al.: Functions and mechanisms of β -Catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell.* 2003, *5*, S.367-377,
- Vehmas et al. 2004 Vehmas A, Lieu J, Pardo CA, et al.: Amyloid precursor protein expression in circulating monocytes and brain macrophages from patients with HIV-associated cognitive impairment. *J Neuroim.* 2004, *157*, S.99-110,
- Vollmer et al. 2001 Vollmer S, Menssen A and Prinz JC: Dominant lesional T cell receptor rearrangements persist in relapsing psoriasis but are absent from nonlesional skin: evidence for a stable antigen-specific pathogenic T cell response in psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2001, *117*, S.1296-1301,
- Weeraratna et al. 2002 Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, et al.: Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell.* 2002, *1*, S.279-288,
- Yang et al. 1998 Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al.: p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant negative activities. *Mol Cell.* 1998, *2*, S.305-316,
- Zhou et al. 2003 Zhou M, Li Z-M and Lavker RM: Transcriptional profiling of enriched populations of stem cells versus transient amplifying cells. *J Biol Chem.* 2003, *281*, S.19600-19609,

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Susanne Donandt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Charakterisierung der funktionellen Rolle von Wnt5a in Keratinozyten bei der Psoriasis vulgaris“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Susanne Donandt

16.10.2007