



Fakultät für Medizin

***In-vitro* Untersuchungen zur Rolle von IRAK-4
Inhibitoren als neuer therapeutischer Ansatz
bei chronisch-entzündlichen
Hauterkrankungen**

Frenz Henning Ohm

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Wolfgang A. Weber

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Kilian Eyerich, Ph.D.
2. Prof. Dr. Julia Jellusova

Die Dissertation wurde am 11.05.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.10.2022 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	Die Haut – ein komplexes Organ	9
1.2	Das menschliche Immunsystem – ein Überblick	11
1.2.1	Das angeborene Immunsystem	11
1.2.2	Das erworbene Immunsystem	12
1.2.2.1	T-Lymphozyten	13
1.2.2.2	T _H -Zell-Subtypen	14
1.3	Chronisch entzündliche Dermatosen	16
1.3.1	Atopisches Ekzem (AE)	16
1.3.2	Psoriasis	18
1.4	Rolle von IRAK-4 im Immunsystem	20
1.5	Zielsetzung der Arbeit	23
2	MATERIALIEN	24
2.1	Geräte	24
2.2	Chemikalien	24
2.3	Reagenzien	25
2.4	Zytokine und Stimulanzen	25
2.5	Kits	25
2.6	Medien und Puffer	26
2.7	Medium-Supplemente	26
2.8	Verbrauchsmaterial	27
2.9	IRAK-4 Inhibitoren	27
2.10	Primer	27
3	METHODEN	29
3.1	Zellkultur	29
3.1.1	Auftauen von Primärzellen	29
3.1.2	Ernte adhärenter Zellen	29
3.1.3	Zellzahlbestimmung	30
3.1.4	Kultivierung und Stimulation von Keratinozyten	30
3.1.5	Kultivierung und Stimulation eines 3D-Keratinozyten-Modells	31
3.1.6	Kultivierung und Stimulation von Fibroblasten	33
3.1.7	Isolation von PBMCs aus Vollblut	34
3.1.8	Isolation von CD4 ⁺ T-Helferzellen	34
3.1.9	Stimulation von T-Zellen	35

3.1.10	Isolation und Stimulation von neutrophilen Granulozyten aus Vollblut	35
3.1.11	Migrationsassay von neutrophilen Granulozyten mit Keratinozytenüberständen	36
3.1.12	Gewinnung von läSIONalem T-Zell-Überstand aus Hautbiopsien	37
3.1.13	Inkubation läSIONaler Hautbiopsien mit IRAK-4 Inhibitoren	39
3.2	RNA-Isolation.....	39
3.2.1	RNA-Isolation aus kultivierten Zellen.....	39
3.2.2	RNA-Isolation aus Hautbiopsien.....	40
3.3	cDNA-Synthese	41
3.4	Bioanalytische Nachweisverfahren	41
3.4.1	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	41
3.4.2	Durchflusszytometrie (FACS)	42
3.4.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	43
3.5	Statistische Auswertung	44
4	ERGEBNISSE.....	46
4.1	IRAK-4 Initiation in primären Keratinozyten	46
4.1.1	Flagellin induziert über Aktivierung des IRAK-4-Signalweges die Expression proinflammatorischer Gene in Keratinozyten	46
4.1.2	Signifikante Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Defensinen durch IRAK-4 Inhibition in Keratinozyten.....	47
4.1.3	IRAK-4 Inhibition im 3D-Keratinozyten-Modell neutralisiert proinflammatorische Effekte nach Stimulation mit läSIONalem T-Zell-Überstand von Patienten mit atopischem Ekzem	49
4.2	IRAK-4 Inhibition in primären neutrophilen Granulozyten	50
4.2.1	IRAK-4 Inhibition in Keratinozyten reduziert das chemotaktische Potential auf neutrophile Granulozyten.....	51
4.2.2	IRAK-4 Inhibition verringert Proteinausschüttung und Genexpression neutrophiler Granulozyten.....	52
4.3	IRAK-4 Inhibition in primären dermalen Fibroblasten	54
4.3.1	IL-1 β induziert Genexpression verschiedener Zytokine in Fibroblasten	54
4.3.2	IRAK-4 Inhibition hat keinen Einfluss auf Expression proinflammatorischer Gene in Fibroblasten	55
4.4	IRAK-4 Inhibition in primären peripheren T-Zellen.....	56
4.4.1	IRAK-4 Inhibitoren reduzieren Zytokinausschüttung von T-Lymphozyten	56
4.4.2	Dosisabhängige Toxizität von IRAK-4 Inhibitoren auf T-Lymphozyten	57
4.5	IRAK-4 Inhibition beeinflusst Genexpression in läSIONalen Hautbiopsien	58
4.5.1	IRAK-4 Inhibition in AE-Biopsien verringert Expression der basophil-chemotaktischen Chemokine <i>MCP1</i> und <i>CXCL8</i> sowie der krankheitsspezifischen Zytokine <i>IL22</i> und <i>TNF</i>	58

4.5.2	IRAK-4 Inhibition in Psoriasis-Biopsien verringert Expression der neutrophil-chemotaktischen Chemokine <i>CXCL8</i> und <i>CXCL5</i> sowie der krankheitsspezifischen Zytokine <i>IL23</i> und <i>TNF</i>	60
4.6	Zusammenfassung der Effizienz der IRAK-4 Inhibitoren in humanen Zellen	61
5	DISKUSSION	63
5.1	Etablierung von <i>small molecules</i> in der Behandlung von Psoriasis und atopischem Ekzem.....	63
5.2	IRAK-4 als attraktives Target in der Behandlung von inflammatorischen und hämatologischen Erkrankungen	64
5.3	Krankheitsrelevante Effekte der IRAK-4 Inhibitoren auf atopisches Ekzem und Psoriasis	65
5.3.1	Atopisches Ekzem	65
5.3.2	Psoriasis	67
5.4	Mögliches Nebenwirkungsprofil	69
5.5	Ausblick	70
6	ZUSAMMENFASSUNG	71
7	LITERATURVERZEICHNIS	72
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	82
9	TABELLENVERZEICHNIS	84
10	DANKSAGUNG	85

Abkürzungsverzeichnis

AE	Atopisches Ekzem
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	Aktivator-Protein 1
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCL	<i>C-C Motif Chemokine Ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FLG	Flagellin
FSC	<i>Forward scatter</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HC	Hydrocortison
HS	<i>Human serum</i>
I	Inhibitor
IFN	Interferon
IKK	<i>Inhibitor of NFκB-Kinase</i>
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
IMQ	Imiquimod

IRAK-4	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 4
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NFκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDE	Phosphodiesterase
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PsA	Psoriasisarthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>Side scatter</i>
Suppl	Supplemente
TAK	TGF-β aktivierte Kinase
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _H	T-Helferzellen
TIR	Toll-IL-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF Rezeptor-assoziiierter Faktor
T _{Reg}	Regulatorische T-Zellen
U	Umdrehungen
US	unstimuliert
ü.N.	über Nacht
V	Volumen
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Die Haut – ein komplexes Organ

Die Haut erfüllt als größtes Organ essenzielle Aufgaben für den menschlichen Körper. Hierzu zählen die Barrierefunktion gegenüber Umwelteinflüssen, Regulation des Temperatur- und Wasserhaushaltes, Wahrnehmung von Temperatur, Druck und Schmerz sowie die immunologisch gesteuerte Abwehr pathogener Erreger. Voraussetzung für diese Funktionen ist das komplexe Zusammenspiel einer Vielzahl verschiedener Zelltypen mit unterschiedlichen Aufgaben. Eine Unterteilung der Haut erfolgt morphologisch - von außen nach innen - in drei Kompartimente: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut) (siehe Abb. 1).

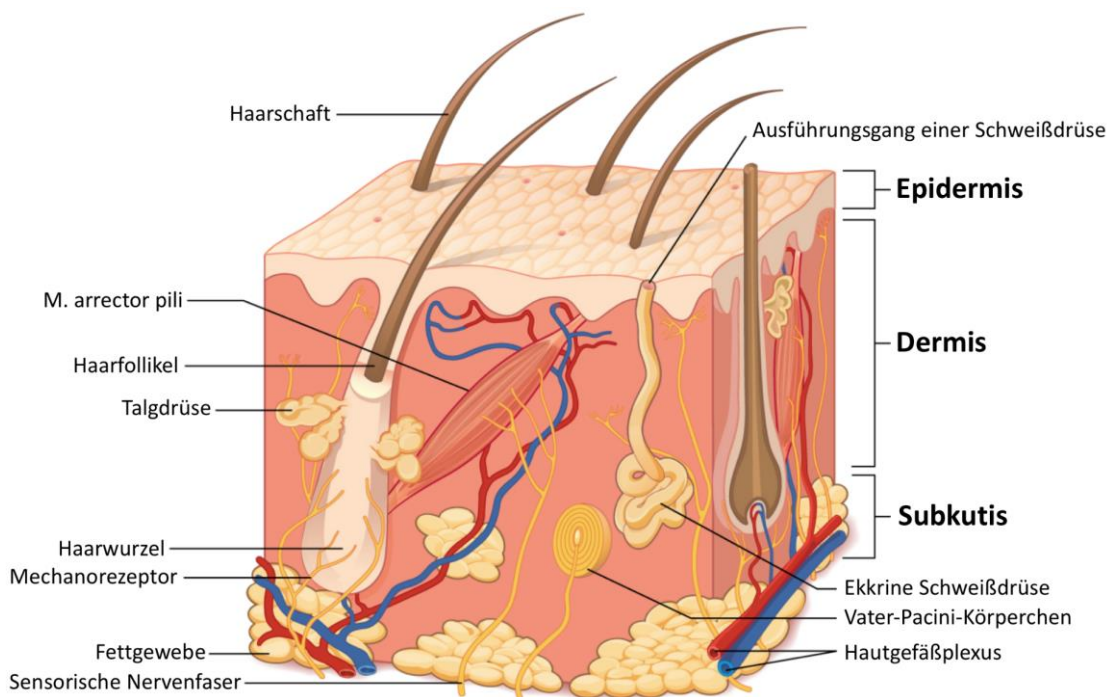


Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut.

Modifiziertes Modell aus *Anatomy and Physiology* (J. Gordon Betts 2013). Dargestellt ist die Dreischichtung der Haut in Epidermis, Dermis und Subkutis.

Die Epidermis bildet als mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel die oberste Hautschicht und übernimmt sowohl eine erste physikalische als auch immunologische Schutzfunktion (Moll et al. 2016). Sie ist über die Basalmembran mit der Dermis verbunden und wird zusammengefasst mit dieser auch als Kutis (Haut) bezeichnet. Die darunterliegende Subkutis fungiert als Bindeglied zwischen Haut und tiefer liegenden

Strukturen wie Muskeln und Knochen. Den wesentlichen Anteil der Epidermis stellen mit über 90 % die Keratinozyten. In deutlich geringerer Zahl sind zudem Melanozyten, Lymphozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen vorhanden (Cerroni et al. 2016). Von den zu Beginn erwähnten vielfältigen Schutzfunktionen der Haut gegenüber den Umwelteinflüssen wird im Folgenden aufgrund der Thematik dieser Dissertation nur auf die immunologischen eingegangen.

Keratinozyten besitzen eine Vielzahl von Immunrezeptoren, über die pathogene Mikroorganismen detektiert werden können. Über Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie Interleukinen und Chemokinen, die der Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen dienen, tragen Keratinozyten zur Initiierung von Immunantworten bei (Foerster et al. 2008). So wurde beispielsweise festgestellt, dass Keratinozyten durch Kontakt mit dem proinflammatorisch wirkenden Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) vor allem Interleukin-1 (IL-1) freisetzen und so über Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, B- und T-Lymphozyten an Entzündungsprozessen teilhaben (Sauder 1990). Darüber hinaus sorgen Keratinozyten über Bildung und Ausschüttung antimikrobieller Peptide für eine ausgewogene Besiedlung der Haut mit Mikroorganismen (Harder und Schroder 2005).

Die in deutlich geringerer Dichte vorliegenden Langerhans-Zellen sind in die Haut eingewanderte Knochenmarkszellen, die der myeloischen Zellreihe entstammen. Sie spielen über Antigenpräsentation bei der Aktivierung von T-Helferzellen ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Initiierung von Immunreaktionen (Moll et al. 2016).

Unter der Epidermis liegt die Dermis, eine an Zellen und Bindegewebsfasern reiche Schicht. Hauptzellpopulation sind die Fibroblasten, die neben der Synthese extrazellulärer Matrix auch zur Produktion und Ausschüttung immunregulierender Zytokine fähig sind (Lynch und Watt 2018). Melanozyten, Langerhans-Zellen und Lymphozyten sind auch hier vorhanden, jedoch in geringerer Zahl als in der Epidermis. Die zunehmende Erkenntnis, dass die Haut neben der offensichtlichen Barrierefunktion als komplexes Konstrukt aus Epithelzellen und Immunzellen viel weitreichendere Funktionen besitzt, macht man sich in der heutigen Dermatotherapie zu Nutze (Plewig et al. 2018).

1.2 Das menschliche Immunsystem – ein Überblick

Um den Organismus vor Erkrankungen durch pathogene Mikroorganismen zu schützen, steht er unter ständiger Kontrolle durch ein komplexes System aus Immunzellen, lymphatischen Organen und humoralen (löslichen) Faktoren. So kann eine Infektion des Körpers durch Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilze frühzeitig erkannt und bekämpft werden. Darüber hinaus erkennt und eliminiert das Immunsystem auch entartete körpereigene Zellen und reguliert sich selbst zum Schutz vor Autoimmunität (Neumann 2008). Das Immunsystem teilt sich auf in die evolutionär ältere Immunabwehr mit angeborenen Fähigkeiten zur Eliminierung von Erregern sowie in die spezifische, erworbene Immunabwehr, die sich durch spezialisierte Zellen und Lernfähigkeit auszeichnet. Im menschlichen Immunsystem sind viele verschiedene Signalwege bekannt, die zur Ausbildung einer Immunreaktion führen. Eine Schlüsselrolle in der Übertragung proinflammatorischer Signale und Auslösung von Immunreaktionen übernimmt die Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 4 (IRAK-4), auf die im Verlauf der vorliegenden Arbeit ausführlich eingegangen wird.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem wird unterteilt in eine zelluläre Komponente, bestehend aus Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen und natürlichen Killerzellen sowie eine nicht-zelluläre (humorale) Komponente, zu der das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme und Interferone zählen. Eindringene Pathogene werden, soweit möglich, durch das angeborene Immunsystem detektiert und eliminiert (Moll et al. 2016).

Die Differenzierung zwischen körpereigenen Molekülen und körperfremden Pathogenen erfolgt über spezielle Rezeptoren. Diese sind spezifisch für bestimmte molekulare Komponenten der Pathogene, die sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP). PAMPs sind Strukturen mit essenziellen Aufgaben in der mikrobiellen Zellfunktion, die auf menschlichen Zellen nicht existieren. Zu ihnen zählen beispielsweise Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien und Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien, wie Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane. Diese mikrobiellen Bestandteile wurden im Laufe der Evolution

konserviert und stellen aufgrund ihrer Unveränderlichkeit optimale Erkennungssignale dar. Die Rezeptormoleküle, an die PAMPs binden, können frei im Blutplasma zirkulieren, auf Zelloberflächen exprimiert sein oder intrazellulär vorliegen. Man bezeichnet sie als „*Pattern recognition receptors*“ (PRR) - wichtigste Vertreter sind die zellgebundenen Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Murphy et al. 2014). Diese werden unterteilt in Subtypen, von denen jeder eine für ihn spezifische Bandbreite an Liganden erkennt. Neben den TLRs existieren weitere membranständige Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, wie z.B. die Interleukin-Rezeptoren (IL-R). Die Aktivierung der Rezeptormoleküle durch Bindung von PAMPs aktiviert die Expression unterschiedlicher Zielgene, z.B. entzündungsmodulierender Zytokine, antimikrobieller Peptide oder Chemokine. Die Weiterleitung der Signale von Zellmembran zum Zellkern erfolgt über eine Reihe von Enzymkomplexen. Hierzu zählt z.B. das *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), das als eines von insgesamt fünf Adaptermolekülen in die Signalkaskaden von TLR, IL-1R, IL-18R und IL-33R involviert ist. Die bereits erwähnte Proteinkinase IRAK-4 spielt in der Signalweiterleitung von aktiviertem MyD88 eine essenzielle Rolle (Cushing et al. 2017).

Die zeitversetzte Aktivierung des erworbenen Immunsystems erfolgt über bestimmte Antigen-präsentierende dendritische Zellen, wie z.B. die Langerhans-Zellen. Nachdem diese eingedrungene Pathogene phagozytiert und Antigenfragmente auf ihrer Zelloberfläche präsentiert haben, migrieren sie in den nächsten Lymphknoten und treten dort mit T-Lymphozyten in Kontakt. Auf diese Weise wird die spezifische Immunantwort auf das entsprechende Antigen induziert (Banchereau und Steinman 1998).

1.2.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem liefert die spezifische, verzögert ablaufende Immunantwort und ist dem angeborenen Immunsystem nachgeschaltet. Es wird auch hier unterschieden zwischen einem humoralen (löslichen) und einem zellulären Teil. Zelluläre Bestandteile der erworbenen Immunabwehr sind die B- und T-Lymphozyten, Antikörper verschiedener Klassen repräsentieren den humoralen Teil.

Zur Erkennung von Pathogenen tragen B- und T-Lymphozyten jeweils verschiedene Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche: den B-Zell-Rezeptor (BCR) und den T-Zell-

Rezeptor (TCR). Während der Lymphozytenreifung werden diejenigen genetischen Informationen, die die Spezifität der Antigen-erkennenden Rezeptoren festlegen, durch Rekombination zu immer neuen Mutationen zusammengefügt. Hieraus resultiert die im Vergleich zur angeborenen Immunität deutlich größere Rezeptorvielfalt des spezifischen Immunsystems (Koecke et al. 2000). Kommt es zur Ausreifung von Rezeptoren, die gegen körpereigene Moleküle gerichtet sind, werden die betroffenen Lymphozyten im Zuge eines Selektionsprozesses herausgefiltert und eliminiert. Fehler in diesem Selektionsprozess können zur Ausprägung von Autoimmunerkrankungen führen (Theofilopoulos et al. 2017).

Die Aktivierung der B-Lymphozyten erfolgt durch Bindung des spezifischen Antigens an den BCR. Auf den Aktivierungsreiz hin entwickelt sich die B-Zelle weiter zu einer Plasmazelle, die ihrerseits Antikörper verschiedener Klassen produziert und sezerniert (humorale Komponente).

1.2.2.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den antigenspezifischen TCR, der die Spezifität der einzelnen Zelle festlegt und an die Antigene bindet. Die Zellen sind allerdings nicht in der Lage, ungebundene (freie) Antigene zu erkennen. Voraussetzung für die Bindung ist, dass ihnen das entsprechende Antigen über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC: *major histocompatibility complex*), der sich auf der Oberfläche von Körperzellen befindet, präsentiert wird (Schütt und Bröker 2009). Dieser kann in mehrere Gruppen von Peptidrezeptoren unterteilt werden, deren wichtigste Vertreter die MHC-Klassen I und II sind. Bei Präsentation eines Antigens über den MHC erfolgt die Aktivierung der beiden unterschiedlichen Subtypen von T-Zellen, nämlich den CD4⁺ (*cluster of differentiation 4*) T-Helferzellen (T_H-Zellen) und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. MHC-I-Klasse-Moleküle interagieren mit CD8, MHC-II-Klasse-Moleküle mit CD4.

CD8⁺ T-Lymphozyten sind dazu in der Lage, Zellen mithilfe von zytotoxischen Proteinen direkt zu lysieren. Sie sind von zentraler Bedeutung für die Abwehr von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen. Den CD4⁺ T-Helferzellen kommt hingegen eine indirekte, steuernde Funktion in der Immunabwehr durch Sekretion von Zytokinen und

nachfolgende Aktivierung und Rekrutierung angeborener und spezifischer Immunzellen zu. Während der Immunantwort differenzieren naive T-Zellen u.a. zu den Subtypen T_{H1} , T_{H2} , T_{H9} , T_{H17} , T_{H22} sowie den regulatorischen T_H -Zellen (T_{Reg}) mit unterschiedlichen Zytokin-Sekretionsmustern aus (s. Abb. 2) (Hirahara und Nakayama 2016).

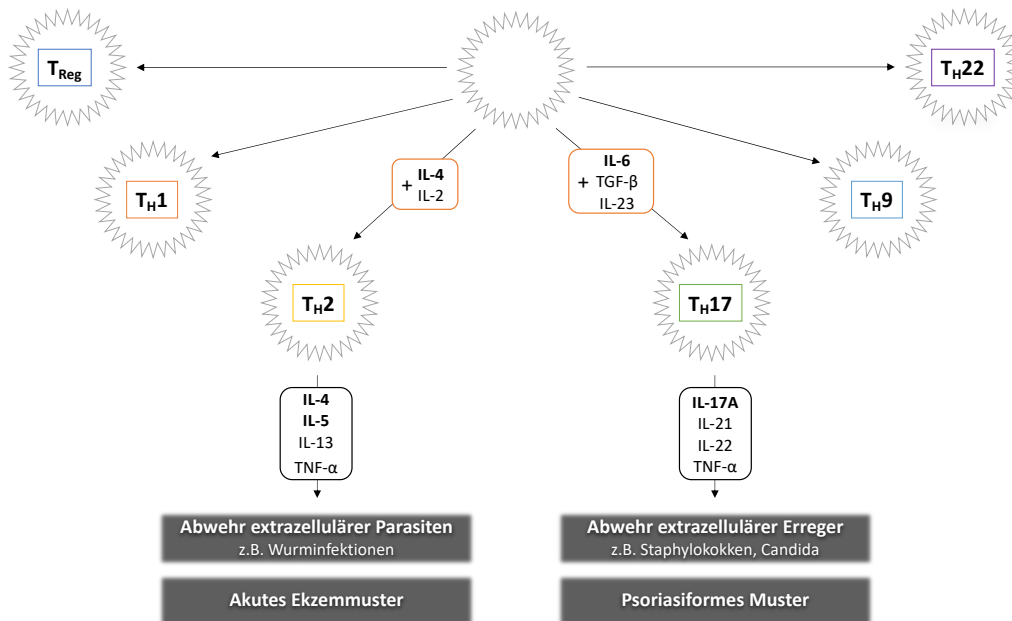


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der $CD4^+$ T_H -Zell-Subpopulationen.

Unter Einfluss von umgebenden Zytokinen reifen die naiven $CD4^+$ T-Zellen zu Effektorzellen der Typen T_{H1} , T_{H2} , T_{H9} , T_{H17} , T_{H22} und T_{Reg} aus. Die Produktion der je nach Zelltyp unterschiedlichen Zytokine führt zu den verschiedenen Funktionen im Rahmen der Immunantwort. Eine detaillierte Darstellung erfolgte in dieser Arbeit nur für die T_{H2} - und T_{H17} -Zellen, die für die untersuchten chronisch entzündlichen Hauterkrankungen Psoriasis und Atopisches Ekzem eine entscheidende Rolle spielen. T_{H2} -Zellen sind über die Sekretion der Interleukine 4, 5 und 13 sowie $TNF-\alpha$ unter anderem für die Stimulation von B-Lymphozyten zur Synthese von Antikörpern verantwortlich. T_{H17} -Zellen nehmen durch Produktion proinflammatorischer Zytokine eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Immunreaktion bei der Psoriasis ein.

1.2.2.2 T_H -Zell-Subtypen

T_{H1} -Zellen differenzieren durch Einwirkung der Zytokine $IFN-\gamma$ und $IL-12$ aus, die von antigenpräsentierenden Zellen nach Detektion eines Pathogens über ihre TLR sezerniert werden. Die T_{H1} -Zellen sind ihrerseits über die Ausschüttung von $IFN-\gamma$, $IL-2$ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α und der damit verbundenen Aktivierung von Makrophagen und natürlichen Killerzellen an der Regulation entzündlicher Prozesse sowie der Entstehung von Typ-IV-Allergien beteiligt (Romagnani 1999).

Im Vergleich dazu differenzieren T_{H2} -Zellen insbesondere nach Kontakt mit $IL-4$ aus. Durch Ausschüttung der typischen Effektorzytokine $IL-4$, $IL-5$, $IL-13$ und $TNF-\alpha$ sind

diese Zellen vor allem an der humoralen Immunantwort beteiligt, da die Ausschüttung von IL-4 zur Aktivierung Antikörper produzierender B-Lymphozyten führt. Die T_H2-Antwort ist dominierend bei Typ-I-Allergien, Asthma, parasitären Infektionen sowie Atopischem Ekzem (O'Garra et al. 2011; Romagnani 1996).

T_H17-Zellen produzieren die Zytokine IL-17A, IL-21, IL-22 sowie TNF- α und vermitteln die Immunantwort auf extrazelluläre Bakterien und Pilze über Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. IL-17A fördert über Hochregulierung des *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) die Ausreifung neutrophiler Granulozyten und wirkt chemotaktisch durch Produktion von *C-X-C Motif Chemokine Ligand* (CXCL) 1, 2 und 5. Außerdem induziert IL-17A die verstärkte Expression von antimikrobiellen Peptiden, die zu einer direkten Zerstörung pathogener Keime führen (Onishi und Gaffen 2010; Weaver et al. 2006). Neben ihrer physiologischen Abwehrfunktion unterhalten T_H17-Zellen die chronische Entzündungsreaktion bei einigen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Psoriasis und rheumatoider Arthritis (Alunno et al. 2012; Martin et al. 2013; Nalbandian et al. 2009).

CD4⁺-T-Zellen, die zwar IL-22, aber keine weiteren T_H17-spezifischen Zytokine ausschütten, werden T_H22-Zellen genannt (Duhon et al. 2009). Sie sind bei Patienten mit atopischem Ekzem und Psoriasis in Hautbiopsien vermehrt nachzuweisen (Nogralles et al. 2009).

T_H9-Zellen haben eine enge Verwandtschaft zu den T_H2-Zellen und erhielten ihren Namen aufgrund des Hauptzytokins IL-9. Dieses wirkt auf unterschiedliche Zelltypen wie eosinophile Granulozyten, Epithelzellen, Mastzellen und andere T-Zellen und spielt bei der Immunantwort auf Infektionen mit Helminthen sowie bei allergischen Erkrankungen eine Rolle (Soussi-Gounni et al. 2001).

Eine weitere wichtige Untergruppe bilden die regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}), die in der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz eine entscheidende Rolle spielen (Curotto de Lafaille und Lafaille 2002). Sie wirken der Entstehung von Autoimmunerkrankungen über Suppression der T-Zell vermittelten Immunantwort entgegen (Sakaguchi et al. 2008). Bei Patienten mit Erkrankungen aus dem atopischen Formen-

kreis ist beispielsweise die Aktivität der T_{Reg}-Zellen besonders während der Pollenflug-saison reduziert, sodass von einer Beteiligung an Entstehung und Verlauf atopischer Erkrankungen ausgegangen werden kann (Grindebacke et al. 2004; Robinson 2009).

1.3 Chronisch entzündliche Dermatosen

Chronisch entzündliche Hauterkrankungen stellen einen großen Anteil an dermatologischen Krankheitsbildern. Sie werden ausgelöst und aufrechterhalten durch überschießende Immunantworten, die durch T-Zellen, unspezifische Immunzellen und Keratinozyten vermittelt werden. Die Entwicklung neuartiger Therapeutika hat in den letzten Jahren zu einer deutlichen Verbesserung der Behandlungsergebnisse geführt (Fernandez et al. 2017).

1.3.1 Atopisches Ekzem (AE)

Beim atopischen Ekzem (AE) handelt es sich um eine familiär gehäuft auftretende entzündliche Hauterkrankung, die klinisch durch starken Juckreiz in Verbindung mit chronisch-ekzematösen Hautveränderungen variabler Morphe in Erscheinung tritt. Das AE kann allein auftreten oder in Verbindung mit weiteren Erkrankungen des atopischen Formenkreises, wie allergischem Asthma bronchiale oder allergischer Rhinokonjunktivitis (Dharmage et al. 2014). Weltweit wird die Prävalenz bei Kindern mit bis zu 20 %, bei Erwachsenen zwischen 1 und 3 % angegeben, Tendenz steigend (Nutten 2015).

Die Pathogenese des AE basiert auf einem komplexen Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren, welches in einem Barrieredefekt der Epidermis, mikrobieller Fehlbesiedlung der Haut und Entzündungsprozessen, vor allem durch T_H2-Zellen, aber in gewissem Maße auch durch T_H1-, T_H22- und T_H17-Zellen, resultiert (Boguniewicz und Leung 2011). Aufgrund der geschädigten Hautbarriere können z.B. Allergene die Haut penetrieren, wo sie nach Aufnahme in antigenpräsentierende Zellen den T-Lymphozyten präsentiert werden. Daraufhin kommt es einerseits zur Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wohingegen antimikrobielle Peptide, wie Defensin und Cathelicidin, vermindert produziert werden. Dies hat bei Patienten mit AE eine häufige bakterielle Besiedlung der Ekzemherde zur Folge (Ong et al. 2002).

T_H2-Zellen sind über Ausschüttung von IL-4, IL-5, IL-13, IL-31 und CCL18 zusammen mit T_H22-Zellen und deren Zytokin IL-22 sowie S100A-Proteinen für das akute Ekzemstadium bei Patienten mit AE verantwortlich (Czarnowicki et al. 2014). Die ausgeschütteten Zytokine haben Einfluss auf die Keratinozytendifferenzierung sowie die Ausbildung von *Tight Junctions* und sind ursächlich für den Barrieredefekt (Danso et al. 2014). Interessanterweise lässt sich auch in nicht läsionaler Haut von Patienten mit AE eine subklinische Inflammation in Form eingewanderter T_H2-, T_H22- und T_H17-Zellen finden (Suarez-Farinas et al. 2011). Neben der T-Zell-Infiltration in die Haut tragen auch andere Immunzellen wie Eosinophile, dendritische Zellen, Mastzellen und Makrophagen zur Inflammation bei (Ilkovitch 2011; Peng und Novak 2015).

Das dominierende Zytokinmuster ist je nach Phase des Ekzems variabel. Während im akuten Stadium eine T_H2-geprägte Immunantwort mit vermehrter Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 überwiegt, dominieren im chronischen Stadium die Zytokine von T_H1-Zellen mit Produktion von IFN- γ , CXCL9, CXCL10 und Th22-Zellen (Gittler et al. 2012). So erklärt sich auch das je nach Stadium unterschiedliche histologische Bild der Erkrankung. Die akut entzündliche Phase ist geprägt von leichter Spongiose, Parakeratose und in die Epidermis eingewanderten Lymphozyten. In chronischen Läsionen sind hingegen Hyperkeratose, Hypergranulose und perivaskuläres Lymphozyteninfiltrat als Ausdruck der Lichenifikation dominierend (Bieber 2010).

Die Therapie des atopischen Ekzems gestaltet sich aufgrund der multifaktoriellen Pathogenese sehr schwierig. Es existiert eine Stufentherapie, die neben Reduktion von Triggerfaktoren sowie konsequenter Anwendung rückfettender Hautpflege eine ganze Reihe topischer und systemischer Medikamente unterschiedlicher Wirkstärken enthält. Ciclosporin und systemische Glucocorticoide werden beispielsweise bei schwerem AE eingesetzt, eignen sich allerdings aufgrund der Nebenwirkungen nicht zur Langzeittherapie. (Simon und Bieber 2014). Verstärkte Forschungsbemühungen der letzten Jahre haben auf der Suche nach einer Kombination aus maximalem Therapieerfolg und gleichzeitig minimalem Nebenwirkungsprofil weitere pharmakologische Angriffspunkte identifiziert. Das medikamentöse Behandlungsspektrum des AE wurde seither um zielgerichtete Therapieformen mit gutem Nutzen-Risiko-Profil erweitert.

Hierzu gehören Biologika, bei denen es sich um Antikörper, Zytokine und Fusionsproteine aus Oberflächenmolekülen handelt, die zu einer Korrektur des fehlgeleiteten Immunsystems führen (Mrowietz und Reich 2009). Seit 2017 besteht eine Zulassung für

den monoklonalen Antikörper Dupilumab, der die Wirkung der proinflammatorischen T_H2-Effektorzytokine IL-4 und IL-13 hemmt (Thaci et al. 2016). Hierunter konnten weitreichende Verbesserungen der Hautbefunde erzielt werden, wenngleich sich unter Monotherapie nur bei ca. 40 % der Patienten vollkommene oder annähernde Symptombefreiheit einstellt (Langan et al. 2020; Simpson et al. 2016). Seit 2021 besitzt zusätzlich der IL-13-Antikörper Tralokinumab die Zulassung zur Behandlung des mittelschweren bis schweren AE (Stölzl und Weidinger 2021). Zahlreiche weitere Biologika, wie z.B. Antikörper gegen IL-17 und IL-22 befinden sich aktuell in der klinischen Prüfung und könnten das Therapiespektrum zukünftig erweitern (Worm et al. 2020). Neben Biologika haben eine ganze Reihe verschiedener niedermolekularer Verbindungen (*small molecules*) Einzug in die Therapie des AE gehalten oder werden aktuell in klinischen Studien getestet, die über die therapeutische Komponente hinaus auch weiteren Aufschluss über die Pathogenese des AE liefern (Brunner et al. 2017).

1.3.2 Psoriasis

Psoriasis vulgaris ist ähnlich dem atopischen Ekzem eine chronisch verlaufende entzündliche Hauterkrankung mit intrinsischen und extrinsischen Triggerfaktoren, bei der ebenfalls eine familiäre Häufung beobachtet werden kann (Weigle und McBane 2013). Das Hautbild wird charakteristischerweise geprägt von scharf begrenzten, schuppenden erythematösen Plaques. Eine Beteiligung von Bindegewebe und Stützapparat führt bei ca. 20 % der Patienten zur sog. Psoriasis-Arthritis mit typischem Befall der distalen Interphalangealgelenke. Das Risiko für Adipositas, Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen ist je nach Ausprägungsgrad sowie Dauer der Erkrankung erhöht und führt bei schwer betroffenen Patienten zu einer um ca. fünf Jahre reduzierten Lebenserwartung (Oliveira Mde et al. 2015). Die Prävalenz liegt weltweit bei über 100 Mio. Menschen und macht damit rund 2 % der Weltbevölkerung aus (Schafer et al. 2011).

Die Pathogenese der Psoriasis ist bis heute nicht vollständig verstanden. Am wahrscheinlichsten ist ein multifaktorieller Entstehungsmechanismus mit Beteiligung von Umwelteinflüssen, genetischer Prädisposition sowie Fehlregulation des Immunsystems (Chandra et al. 2015). Die makroskopisch sichtbaren Hautveränderungen resultieren aus einem proinflammatorisch und hyperkeratotisch wirkenden Zusammenspiel

von Keratinozyten und anderen Immunzellen (Bos et al. 2005). Inzwischen wird IL-17A, welches überwiegend von T_H17-Zellen sezerniert wird, als ausschlaggebendes Zytokin der Psoriasis angesehen (Martin et al. 2013). IL-17A hat Effekte auf die Differenzierung, Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen wie Neutrophile aber auch Keratinozyten sowie auf die Bildung antimikrobiell wirkender S100-Proteine (Monin und Gaffen 2018; Onishi und Gaffen 2010). In der Epidermis führt IL-17A zu Hyperproliferation und Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine durch Keratinozyten, sodass Neutrophile und Makrophagen in die psoriatischen Plaques einwandern. Neutrophile unterhalten ihre eigene Aktivierung über Produktion von IL-17 und verstärken die durch Keratinozyten ausgelösten entzündlichen Prozesse (Zeichner und Armstrong 2016). Die Ausdifferenzierung und Aktivierung der T_H17-Zellen erfolgt unter anderem durch den Einfluss von IL-23 (Hawkes et al. 2018), welches von kutanen dendritischen Zellen nach Kontakt mit IFN- α im Rahmen einer Entzündungsreaktion auf exogene Triggerfaktoren ausgeschüttet wird (Hawkes et al. 2017; Zeichner und Armstrong 2016). Das von T_H17- und T_H22-Zellen ausgeschüttete Zytokin IL-22 trägt über Hemmung der Keratinozytendifferenzierung zusätzlich zur Verhornungsstörung bei (Wolk et al. 2009). Folglich ist das typische histologische Erscheinungsbild der Psoriasis geprägt von Akanthose mit elongierten Reteleisten bis ins Stratum papillare. Außerdem kommt es zur Parakeratose mit zellhaltigen Keratinozyten in oberflächlichen Schichten der Epidermis als Ausdruck einer verkürzten Reifungsdauer (Perera et al. 2012). Typischerweise werden in die Epidermis eingewanderte T-Zellen (T_H1, T_H17) sowie neutrophile Granulozyten beobachtet (Lowes et al. 2008; Zaba et al. 2009).

Die therapeutischen Optionen sind sehr vielfältig und im letzten Jahrzehnt um zahlreiche Wirkstoffe erweitert worden, eine vollständige Heilung ist jedoch bis dato nicht möglich. Zur Anwendung kommen topische und systemische Therapeutika sowie phototherapeutische Maßnahmen - je nach Schwere der Erkrankung als Mono- oder Kombinationstherapie. Analog zum AE wächst, neben konventionellen Systemtherapeutika wie z.B. Methotrexat oder Dimethylfumarat zur Therapie der mittelschweren bis schweren Psoriasis, der Markt an Biologika und *small molecules* stetig. Zu den eingesetzten Wirkstoffklassen zählen neben dem oralen Phosphodiesterase-(PDE-)4-Inhibitor Apremilast zielgerichtete Biologika zur Inhibition von TNF- α (z.B. Adalimumab), IL-17 (Ixekizumab, Secukinumab) und IL-23 (Guselkumab, Risankizumab, Tildrakizumab)

(Muller et al. 2020). Da die Hautbefunde von Psoriasispatienten unter moderner Biologika-Therapie in vielen Fällen nahezu blande sind, hat sich der Fokus zunehmend auf die Behandlung von Begleitmanifestationen wie Psoriasisarthritis (PsA) und Nagelpsoriasis verlagert (Gladman et al. 2017).

1.4 Rolle von IRAK-4 im Immunsystem

IRAK-4 ist eine Proteinkinase mit Aufgaben in der Signalweiterleitung von TL-, IL-1-, IL-18- und IL-33-Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden nicht nur von Zellen des angeborenen Immunsystems - wie dendritischen Zellen und Makrophagen - exprimiert, sondern auch von Fibroblasten, B- und T-Lymphozyten sowie Epithelzellen (Kawasaki und Kawai 2014). Es werden vier Mitglieder der IRAK-Familie unterschieden, die alle Bestandteile von Signalwegen der o.g. Rezeptoren sind: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M und IRAK-4. Von diesen ist ausschließlich IRAK-4 mit ihrer Kinaseaktivität Voraussetzung für die Signalweiterleitung und die Aktivierung von MAPK (*mitogen-activated proteine kinase*) sowie dem Transkriptionsfaktor NF κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) (Li et al. 2002; Lye et al. 2004). Da der Funktionsverlust von IRAK-4 zu einem vollständigen Signalabbruch führen kann, was bereits im Mausmodell und für IRAK-4-defiziente Patienten beschrieben wurde, bietet die Kinase ein interessantes Ziel für mögliche therapeutische Interventionen bei entzündlichen Hauterkrankungen (Picard et al. 2003; Suzuki et al. 2002). Mutationen in dem für IRAK-4 codierenden Gen führen beispielsweise zu wiederkehrenden invasiven Pneumokokkeninfektionen (Turvey und Speert 2007).

Die Aktivierung des Signalweges von TL-, IL-1, IL-18- und IL-33-Rezeptoren erfolgt über eine Komplexbildung aus Ligand und Rezeptor. Beim Menschen sind zehn exprimierte TLR-Gene bekannt, wobei jeder Rezeptor bestimmte molekulare Muster erkennt (Murphy et al. 2014). Eine Übersicht der verschiedenen TLR-Liganden bietet Tabelle 1.

Tabelle 1: Angeborene Immunerkennung durch Toll-like-Rezeptoren. Aufgeführt sind die bekannten TLR des Menschen mit ihren jeweiligen mikrobiellen Erkennungsmustern sowie ihrer Lokalisation. Die TLR-1 und -2 sowie TLR-2 und -6 bilden Heterodimere. LPS = Lipopolysaccharide. (Murphy et al. 2014)

Toll-like Rezeptor	Ligand	Lokalisation
TLR-1:TLR-2-Dimer	Lipomannane (Mykobakterien) Lipoteichonsäuren (grampositive Bakterien) Lipoproteine	Zelloberfläche
TLR-2:TLR-6-Dimer	β-Glucane der Zellwände (Bakterien und Pilze) Zymosan (Pilze)	
TLR-3	Doppelsträngige RNA (Viren)	Endosom
TLR-4	LPS (gramnegative Bakterien) Lipoteichonsäuren (grampositive Bakterien)	Zelloberfläche
TLR-5	Flagellin (Bakterien)	Zelloberfläche
TLR-7	Einzelsträngige RNA (Viren), Imiquimod	Endosom
TLR-8	Einzelsträngige RNA (Viren)	Endosom
TLR-9	DNA mit nicht methyliertem CpG (Bakterien und Herpesviren)	Endosom
TLR-10	Unbekannt	Unbekannt

TLR-1, TLR-2 und TLR-6 sind an der Zellmembran lokalisiert und können von verschiedenen Liganden aktiviert werden. Hierzu zählen Diacyl- und Triacyllipoproteine von gramnegativen Bakterien sowie Lipoteichonsäuren grampositiver Bakterien. Die Bindung eines Liganden führt zur Ausbildung von Heterodimeren aus TLR-1 und TLR-2 oder TLR-2 und TLR-6. Die zytoplasmatisch gelegenen Toll-IL-1-Rezeptor-(TIR-)Domänen lagern sich als Folge der Dimerisierung zusammen und lösen so die Signalweiterleitung aus (Gay und Gangloff 2007).

TLR-4 erkennt die Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, einen integralen Bestandteil der äußeren Membran. TLR-5 bindet eine Untereinheit der Bakteriengeißel, das sog. Flagellin.

Die TLR-3, -7, -8 und -9 liegen intrazellulär in den Endosomen und wirken über Erkennen von Nukleinsäuren, die z.B. durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen wurden, an der Abwehr von Viren mit (Murphy et al. 2014).

Die Stimulation der IL-Rezeptoren erfolgt über die Zytokine IL-1α, IL-1β, IL-18, IL-33, IL-36α, IL-36β und IL-36γ (Garlanda et al. 2013).

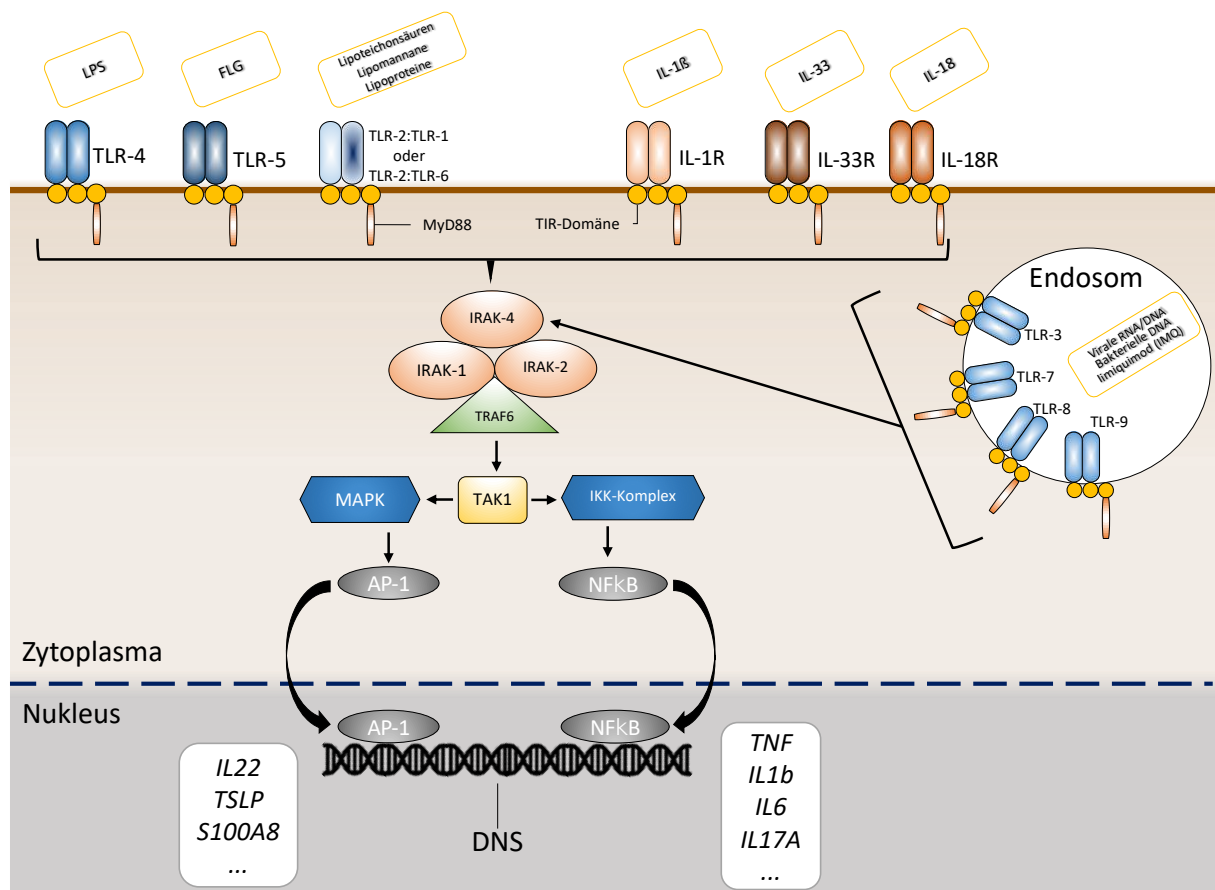


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Signalkaskade von TL- und IL-Rezeptoren.

Wenn ein extrazellulärer Ligand (z.B. LPS, FLG, IL-1 β , IL-33, IL-18, IMQ) auf den passenden TL- oder IL-Rezeptor an der Zelloberfläche trifft, wird das entsprechende Signal ins Zellinnere weitergeleitet. Dabei verändert sich die intrazellulär gelegene Rezeptordomäne und aktiviert den sog. Myddosomenkomplex, bestehend aus MyD88 sowie IRAK-4, IRAK-1, IRAK-2 und TRAF6. Dieser wiederum aktiviert die Proteine TRAF6 und TAK1, woraufhin sich die Signalweiterleitung über MAPK und AP-1 sowie den IKK-Komplex und NF κ B weiter fortsetzt. Ein Endpunkt der Aktivierung kann z.B. die Aktivierung oder auch Deaktivierung von inflammatorischen sowie zellzyklus-spezifischen Genen sein.

TLRs sind transmembranöse Glykoproteine, die aus 16-18 extrazellulär gelegenen Leucin-reichen Sequenzen bestehen, die für die Erkennung von PAMPs zuständig sind. Eine zytoplasmatisch gelegene TIR-Domäne rekrutiert nach einem Konformationswechsel das Adaptermolekül MyD88, dessen Todesdomäne wiederum zur Aktivierung der IRAK-Familie führt. Hierbei wird der sog. Myddosomenkomplex gebildet, wobei zunächst IRAK-4 als am weitesten proximal gelegene Kinase, gefolgt von IRAK-1 und IRAK-2, rekrutiert wird (Ferrao et al. 2014). IRAK-4 besitzt die Fähigkeit zur Signalweiterleitung über Autophosphorylierung sowie Phosphorylierung von IRAK-1 und IRAK-2 (Li et al. 2002). Über weitere Moleküle, wie den TNF Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) und die TGF- β aktivierte Kinase 1 (TAK1) kommt es zur Phosphorylierung des IKK- (*Inhibitor of NF κ B-Kinase*) Komplexes und anschließend u.a. zur

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B. Dieser wandert in den Zellkern und induziert die Expression proinflammatorischer Gene, wie z.B. *TNF* und *IL1b*, die zur Bildung des entzündungsfördernden Prostaglandins E2 führen (Deng et al. 2000). Die durch TAK1 aktivierte MAPK führt über den Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator-Protein 1) zur Expression von Genen, die für Zelldifferenzierung, Zellteilung und Zelltod verantwortlich sind (s. Abb. 3) (Ameyar et al. 2003).

Die Expression vieler inflammatorischer Markergene von Psoriasis (z.B. TNF, IL6, IL17, IL12, IL23) und atopischem Ekzem (z.B. IL22, IL33, TSLP) wird über die beschriebene Signalkaskade respektive die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 reguliert (Goldminz et al. 2013). Somit wird die pathogenetische Relevanz des IRAK-4 Signalweges für beide Erkrankungen deutlich.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die Beobachtung, dass IRAK-4 Inhibitoren im Mausmodell entzündungsmodulierende Eigenschaften besitzen. Nach Induktion von entzündlichen Hautreaktionen konnten die pathophysiologisch relevanten Zytokine und Zelltypen über IRAK-4 gehemmt werden. Resultierend kam es zu einer laborchemisch messbaren Entzündungshemmung sowie Verbesserung des klinischen Bildes. Auf Grundlage dieser Ergebnisse lautet die Fragestellung dieser Arbeit, inwieweit die beobachteten Effekte der Inhibitoren auf menschliche Immun- und Epithelzellen übertragbar sind. Die Laborarbeit erfolgt in Kooperation mit dem belgischen Pharmaunternehmen *Galapagos*, das auf die Erforschung und Entwicklung von therapeutisch wirksamen *small molecules* spezialisiert ist. Zur Anwendung kamen neben zwei Inhibitoren aus deren Herstellung auch ein Compound einer anderen Pharmafirma.

Sollten ähnliche Ergebnisse wie im Mausmodell erzielt werden, wäre damit ein potenziell zentraler Angriffspunkt in der Therapie der chronisch entzündlichen Hauterkrankungen Psoriasis und Atopische Dermatitis gefunden.

2 Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Typ	Firma, Standort
Durchflusszytometer	BD LSRT Fortessa	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Eisschrank (-80 °C)	Hera freeze	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator	Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipet Boy	Strippetor Ultra	Corning, Corning, USA
Real-time PCR Maschine	ViiA7	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sicherheitswerkbank	Cell Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
TissueLyser	Qiagen	Hilden, Deutschland
Vortexmischer	Genie2	Bender + Hobein AG, Bruchsal, Deutschland
ELISA Reader	Epoch	BioTek Instruments, Winooski, USA

2.2 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Bestellnummer	Firma, Standort
Chloroform	366919	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dithiothreitol (DTT)	A1101	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	1085430250	Merck, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂	C-7902	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Vitamin C	A5960-25G	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kollagen Typ I	C3867-1VL	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.3 Reagenzien

Tabelle 4: Reagenzien

Enzyme / Reagenzien	Bestellnummer	Firma, Standort
LymphoPrep	1114547	Progen Biotechnik, Heidelberg, Deutschland
2 % Dextran Lösung	D8802	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
QIAzol Lysis Reagent	79306	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase Zap	R2020	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNAlater Solution	1018087	Qiagen, Hilden, Deutschland
DAPI	62248	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	Zusammensetzung	
TMB-Substratlösung	5500 µl Citratpuffer + 2,55 H ₂ O ₂ + 55 µl TMB	

2.4 Zytokine und Stimulanzen

Tabelle 5: Zytokine und Stimulanzen

Zytokin, Stimulanz	Bestellnummer	Firma, Standort
Lipopolysaccharide (LPS)	tIrl-smIps	InvivoGen, San Diego, USA
Flagellin (Flg)	tIrl-stfla	InvivoGen, San Diego, USA
Imiquimod (IMQ)	TIrl-imqs	InvivoGen, San Diego, USA
Interleukin 1β (IL-1β)	C-61120	Promokine
GM-CSF	130-093-865	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.5 Kits

Tabelle 6: Kits

Kit	Bestellnummer	Firma, Standort
Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)	04913914001	Roche, Basel, Schweiz
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
InviTrapSpin Universal RNA Mini Kit	1060100300	Stratec Biomedical, Birkenfeld, Deutschland
miRNase Mini Kit	217004	Qiagen, Hilden, Deutschland
CD4+ T cell isolation Kit	130-096-533	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD45RO Microbeads	130-046-001	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.6 Medien und Puffer

Tabelle 7: Medien und Puffer

Medium	Zusammensetzung
Fibroblastenmedium	DMEM, 1 % P/S, L-Glutamin, 20 % FCS
Keratinocytenmedium	DermaLife Basal Medium ± Supplemente ± HC ± P/S
T-Zell-Medium 1 %, 5 %	RPMI, Glutamin, P/S, Na-Pyruvat, NEAA, Humanserum (1 %, 5 %)
RBC Lysis Puffer	NH ₄ Cl, KHCO ₃ , EDTA, H ₂ O
FACS-Puffer	PBS ± Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , 5 % FCS, 0,02 % Natriumazid-Lsg.

2.7 Medium-Supplemente

Tabelle 8: Medium-Supplemente

Supplement/Puffer	Bestellnummer	Firma, Standort
DMEM	41699-029	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
0,5 % EDTA pH 8,0	11568896	Invitrogen Life Technologies, Grand Island, USA
0,05 % Trypsin	25300-054	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
RPMI1640	25030-024	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
DermaLife K LifeFactors Kit	LS-1030	Lifeline Cell Technology, Frederick, USA
PBS	14190-094	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Humanes Serum	H4522-100ML	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MEM-NEAA	11140-035	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
L-Glutamine	25030-024	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Sodium Pyruvate	11360-039	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
FCS	SV30160.02	GE Healthcare, Chicago, USA

2.8 Verbrauchsmaterial

Tabelle 9: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer	Firma, Standort
6-well TC Platte	353046	Falcon (BD), Franklin Lakes, USA
48- und 96-well Platte	351177	Falcon (BD), Franklin Lakes, USA
384-well Platte Microplate Frame Star (für qRT-PCR)	4ti-0254	4titude, Dorking, UK
ChemoTx® Disposable Chemotaxis System	101-5	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
CELLSTAR Polypropylen Röhren (15 ml, 50 ml)	188261, 227261	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
MicroTubes SafeSeal (1,5 ml, 2 ml)	72.706, 72.695.500	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR 8-tube Streifen und Kapfen	10217161	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S Standard (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	0030000-854,-889,-927	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen SurPhob Safe Seal (10 µl, 200 µl, 1250 µl)	VT01-18,-48,-78	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Polycarbonat-Insert	PIHP01250	Merck Millipore, Billerica, USA

2.9 IRAK-4 Inhibitoren

Tabelle 10: IRAK-4 Inhibitoren

Inhibitor	Firma
IRAK-4 Inhibitor 1 (I1)	Galapagos
IRAK-4 Inhibitor 2 (I2)	Pfizer
IRAK-4 Inhibitor 3 (I3)	Galapagos

2.10 Primer

Tabelle 11: Primer

Zielgen	Richtung	Sequenz (5' – 3')	Firma, Standort
CCL5	fw rev	GGTACCATGAAGGTCTCCGC GGTGTCCGAGGAATATGGGG	Metabion, Martinsried, Deutschland
CCL17	fw rev	ACTTCAAGGGAGCCATTCCC GCACAGTTACAAAACGATGGC	Metabion, Martinsried, Deutschland
CXCL5	fw rev	CAGACCACGCAAGGAGTTCA TCTTCAGGGAGGCTACCACT	Metabion, Martinsried, Deutschland
CXCL8	fw rev	ACCGGAAGGAACCATCTCAC GGCAAACTGCACCTTCACAC	Metabion, Martinsried, Deutschland

DEFB4A	fw rev	AAGGTGGAAGGCTTGATGTCC TACCACCAAAAACACCTGGAA	Metabion, Martins- ried, Deutschland
FLG2	fw rev	ACCAAGCAAGATGGGGAGTG GTCTGGAT- CATCTGGGTTCTTCA	Metabion, Martins- ried, Deutschland
IL1b	fw rev	AAGCCCTTGCTGTAGTGGTG GAAGCTGATGGCCCTAAACA	Metabion, Martins- ried, Deutschland
IL6	fw rev	TTCGGTCCAGTTGCCTTCTC TACATGTCTCCTTTCT- CAGGGC	Metabion, Martins- ried, Deutschland
IL19	fw rev	ATCATCAGGAGCCAAACCCC TCTGTTCTGACATTGCCGC	Metabion, Martins- ried, Deutschland
IL22	fw rev	ACAGCAAATCCAGTTCTCAA TCCAGAGGAATGTGCAAAG	Metabion, Martins- ried, Deutschland
IL23A	fw rev	CTCAGGGACAACAGTCAGTTC ACAGGGCTATCAGGGAGCA	Metabion, Martins- ried, Deutschland
IL33	fw rev	AGCTGGGAAAATCCCAACAGA AGCAAGATACTCTG- TAATAGGTGAA	Metabion, Martins- ried, Deutschland
IL37	fw rev	CAAGCCTCCCACCATGAAT GCAAAGAAGATCTCTGGGCG	Metabion, Martins- ried, Deutschland
IRF7	fw rev	GCCACTGTTTAGGTTTCGCTTT AGGTGTTGAACCAAGTGTCCAG	Metabion, Martins- ried, Deutschland
LCE3A	fw rev	GAGTCACCACAGATGCC CTTGCTGACCACTTCCC	Metabion, Martins- ried, Deutschland
MCP1	fw rev	TCCCAAAGAAG- CTGTGATCTTCA TTTGCTTGCCAGGTGGTCC	Metabion, Martins- ried, Deutschland
PRTN3	fw rev	GGCATCTGCTTCGGAGACT CCAGTCCACGTAGAGGGCTA	Metabion, Martins- ried, Deutschland
S100A7	fw rev	TCCAAACACACACATCTCACT TCTTGTCATCACGTCTGGTGT	Metabion, Martins- ried, Deutschland
S100A8	fw rev	TTTCAGGTGGGGCAAGTCC CGTCTG- CACCTTTTTCTGATA	Metabion, Martins- ried, Deutschland
S100A9	fw rev	GGCTTTGACAGAGTGCAAGAC GCCCCAGCTTCACAGAGTAT	Metabion, Martins- ried, Deutschland
TNF	fw rev	TGTTGTAGCAAACCCTCAAGC ATGAGGTACAGGCCCTCTGA	Metabion, Martins- ried, Deutschland
TSLP	fw rev	CTCTCGACTTGTGTTCCCCG TGCCTGAGTAGCATTATCT- GAGT	Metabion, Martins- ried, Deutschland
18S	fw rev	GTAACCCGTTGAACCCATT CCATCCAATCGGTAGTAGCG	Metabion, Martins- ried, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die nachfolgend beschriebenen Schritte zur Kultivierung verschiedener Zelllinien erfolgten in einem Zellkulturlabor der Sicherheitsstufe eins unter einer sterilen Werkbank mit Abzug. Alle verwendeten Materialien und Medien waren steril. Die Zellen wurden in einem Inkubator, sofern nicht anders beschrieben, bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Menschliche Hautproben (Stanzbiopsien) und aus Blut isolierte Zellen wurden von der Biobank Biederstein bezogen. Die Laborarbeit wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München (Nummer 44/16S) genehmigt und nach den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Probanden (Hautproben, Blutproben) gaben ihre schriftliche Einwilligung nach erfolgter Aufklärung.

3.1.1 Auftauen von Primärzellen

Primäre Keratinozyten, Fibroblasten und läsionale T-Zellen wurden aus Hautbiopsien isoliert, expandiert und bis zur weiteren Nutzung im Rahmen der Biobank Biederstein in einem Stickstofftank bei -196 °C gelagert.

Die Zellen wurden in einem warmen Wasserbad zügig aufgetaut, anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß transferiert und mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und zentrifugiert (1200 U/min, 10 min, 4 °C).

3.1.2 Ernte adhärenter Zellen

Die Einleitung der Zellernte erfolgte nach einem Waschvorgang mit 2 ml PBS durch Zugabe von 500 µl Trypsin-EDTA-Lösung pro 6-Well und Inkubation im Brutschrank für 8 min bei 37 °C. Anschließend wurde die Enzymwirkung mit 1 ml Fibroblastenmedium (20 % FCS) pro 6-Well gestoppt. Nach einem erneuten Waschvorgang mit PBS wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1200 U/min, 10 min, 4 °C). Die entstandenen Zellpellets wurden nach Verwerfen des Überstandes bis zur RNA-Präparation bei -20 °C gelagert.

3.1.3 Zellzahlbestimmung

Nach dem Auftauen der Keratinozyten erfolgte die Bestimmung der Zellzahlen in einer Zählkammer nach Neubauer. Hierfür wurden die Zellen in 1 ml Keratinozytenmedium plus Supplementen und Hydrocortison (Kera-Medium + Suppl + HC) resuspendiert. Zur Differenzierung zwischen vitalen und abgestorbenen Keratinozyten wurde die Suspension im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau gefärbt. Der Farbstoff dringt nur in abgestorbene, perforierte Zellen und erlaubt so eine mikroskopische Unterscheidung. Nach Überführung in die Zählkammer wurden die lebenden Zellen aus vier großen Quadranten mithilfe eines Lichtmikroskops gezählt und daraus der Mittelwert (MW) gebildet. Die Gesamtzellzahl wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellzahl} = \text{MW} \times 10^4 \times \text{Verdünnung} \times V \text{ (ml)}$$

3.1.4 Kultivierung und Stimulation von Keratinozyten

Die verwendeten Keratinozyten stammen aus der Biobank Biederstein und wurden im Vorfeld der Versuche projektunabhängig mit Hilfe der Suction-Blister-Technik („Saugblasentechnik“) aus der Haut von Patienten durch Jana Sänger gewonnen. Durch zwei- bis dreistündige Anlage eines Sauggerätes mit einem Unterdruck von ca. 200 - 300 mmHg erfolgte die Trennung von keratinozytenhaltiger Epidermis und Dermis im Bereich der *Lamina lucida*. Anschließend wurden die Keratinozyten auf Feederzellen expandiert und bis zur weiteren Verarbeitung in DMEM-Einfriermedium in einem Flüssigstickstofftank bei -196 °C gelagert.

Die Kultivierung der Keratinozyten erfolgte in 6-Well-Platten, wobei 0,15 - 0,25 x 10⁶ Zellen in 2 ml Kera-Medium + Suppl + HC pro Well ausgesät und inkubiert wurden. Ein Mediumwechsel zur Extraktion toter Zellen fand nach Tag eins statt. Ein Anwachsen der Keratinozyten wurde lichtmikroskopisch regelmäßig überprüft. Nach Erreichen einer Zellkonfluenz von 70-80 %, abhängig vom Spender zwischen Tag drei und fünf, erfolgte die Zellstimulation. Hierzu wurden die Zellen zunächst für fünf Stunden in 2 ml Kera-Medium - Suppl - HC gestarvt. Die anschließende Sti-

mulation der Zellen erfolgte in 1 ml Kera-Medium + Suppl - HC. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit den entsprechenden Inhibitoren in drei verschiedenen Konzentrationen für 1 h vorinkubiert (s. Tab. 12).

Tabelle 12: Konzentrationen der eingesetzten IRAK-4 Inhibitoren

IRAK-4 Inhibitor	Konzentration (μM)
Inhibitor 1	0,1; 1; 10
Inhibitor 2	0,1; 1; 10
Inhibitor 3	0,1; 1; 10

Im Anschluss erfolgte in Anwesenheit der jeweiligen Inhibitoren die Stimulation mit Flagellin (100 ng/ml), läSIONalem T-Zell-Überstand (TCS, 1:10 verdünnt), LPS (100 ng/ml), Imiquimod (IMQ) (25 ng/ml) oder IL-1 β (50 ng/ml) über Nacht (12-16 Stunden) zur Gewinnung von RNA bzw. für drei Tage zur Gewinnung von Keratinozyten-Überstand für den nachfolgenden Migrationsassay. Die Zellernte erfolgte am nächsten Morgen wie in Kap. 3.1.2 beschrieben.

3.1.5 Kultivierung und Stimulation eines 3D-Keratinozyten-Modells

Das humane 3D-Hautmodell nähert sich durch Berücksichtigung der dritten Dimension und der verschiedenen Differenzierungsstadien der Keratinozyten dem physiologischen System an. Im Unterschied zur Kultivierung einschichtiger Keratinozyten wurden die Zellen des 3D-Modells auf Polycarbonat-Zellkultur-Inserts ausgesät und dem Kera-Medium CaCl₂ zur Induktion der Differenzierung und Vitamin C (VitC) als Antioxidans zugesetzt. Um ein mehrschichtiges Modell zu erhalten, wurden die Keratinozyten neun Tage im *Air-Liquid Model* kultiviert, alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Im Folgenden wird der von Manja Jargosch durchgeführte Versuch detailliert beschrieben.

Jeweils 3×10^6 Keratinozyten wurden nach dem Auftauen und einem Waschvorgang mit PBS in 12 ml Kera-Medium + Suppl + HC resuspendiert, anschließend in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und inkubiert. Einen Tag später erfolgte ein Mediumwechsel. Nach Erreichen einer Zellkonfluenz von 80-95 % erfolgte die Zellernte am Tag vier. Im Unterschied zum Erntevorgang aus Kapitel 3.1.2 war darauf zu achten, dass die

Trypsinierung nach maximal 5 min abgestoppt wurde, um die Oberflächenproteine und *Tight Junctions* der Keratinozyten zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.2 gezählt und resuspendiert. Neben Supplementen und Hydrocortison wurde dem Medium 1,5 mM CaCl_2 hinzugegeben, welches für die Differenzierung der Keratinozyten essenziell ist.

Im nächsten Schritt wurden jeweils $0,3 \times 10^6$ Keratinozyten in 500 μl Kera-Medium + Suppl + HC + CaCl_2 in Polycarbonat-Zellkultur-Inserts (12 mm Durchmesser, 0,4 μm Porengröße, Millipore), welche in 6-Well-Platten gesetzt wurden, ausgesät. Das umgebende 6-Well wurde mit 2,5 ml Kera-Medium + Suppl + HC + CaCl_2 befüllt. Zwei Tage später, nach Anwachsen der Hautzellen an die Inserts, wurde ein sog. *Airlift* durchgeführt. Durch Absaugen des Mediums aus dem Insert wurden die Keratinozyten fortan – wie in der menschlichen Haut physiologisch – an ihrer Oberseite der Umgebungsluft ausgesetzt.

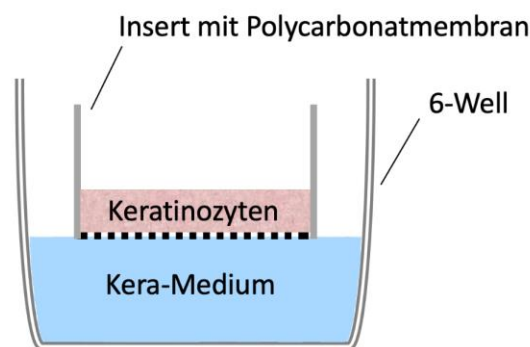


Abbildung 4: Menschliches 3D-Hautmodell nach durchgeführtem Airlift.

Nach Aussaat auf einer Polycarbonatmembran erfolgte die Ernährung der Keratinozyten in der weiteren Wachstums- und Differenzierungsphase ausschließlich durch das darunter liegende Kera-Medium im Air-Liquid Model.

Das verbleibende Medium wurde in diesem Schritt von 2,5 auf 2 ml reduziert. Die weitere Kultivierung erfolgte für acht Tage, wobei dem Medium zusätzlich 50 $\mu\text{g/ml}$ VitC als antioxidative Komponente zugegeben wurde. Alle 2 bis 3 Tage fand ein Mediumwechsel statt. 24 Stunden vor der Zellernte erfolgte die einstündige Prä-Inkubation mit den jeweiligen IRAK-4 Inhibitoren in einer Konzentration von 10 μM in 2 ml Kera-Medium - HC + CaCl_2 + VitC sowie anschließende Stimulation mit T-Zell-Überstand (1:10 verdünnt) von AE-Patienten (Gewinnung s. Kap. 3.1.12) in 2 ml Kera-Medium + Suppl - HC + CaCl_2 + VitC in Anwesenheit der IRAK-4 Inhibitoren. Im Rahmen der Zellernte wurde das Insert entnommen, die Membran mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Lysispuffer (Stratec Kit) plus DTT (Dithiothreitol) überführt. Bis zur

RNA-Präparation erfolgte die Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das histologische Ergebnis des 3D-Modells im Vergleich zur menschlichen Haut ist in Abb. 5 dargestellt.

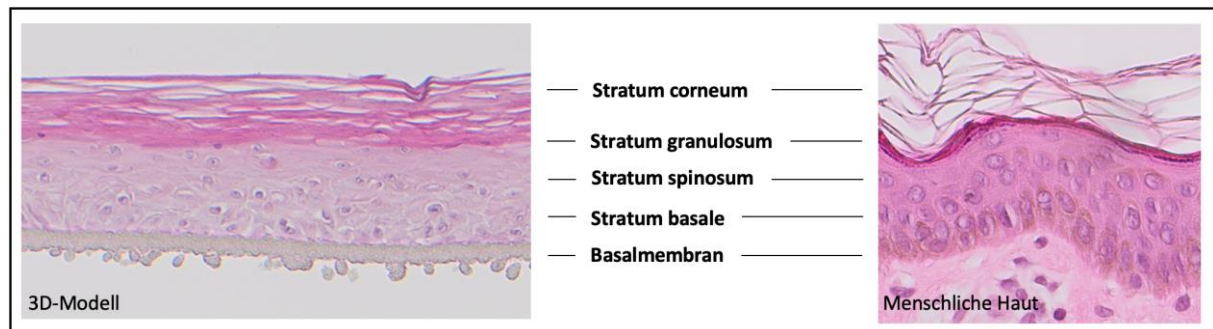


Abbildung 5: Vergleich des histologischen Aufbaus von 3D-Keratinozyten-Modell und menschlicher Haut. Alle vier Schichten der Epidermis sowie die darunterliegende Basalmembran sind klar abgrenzbar.

3.1.6 Kultivierung und Stimulation von Fibroblasten

Die verwendeten Fibroblasten stammten aus der Biobank Biederstein und wurden im Vorfeld der Versuche projektunabhängig aus Vollhautbiopsien von Patienten durch Jana Sänger gewonnen. Hierzu wurde die Biopsie zunächst in der Ecke einer 10 ml Zellkulturflasche platziert und 500 μl Fibroblastenmedium hinzugegeben. Über 2 bis 4 Wochen erfolgte die Auswanderung der Fibroblasten aus der Biopsie. Anschließend wurden die Zellen nach Trypsinierung geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung in Flüssigstickstoff gelagert.

Nach Auftauen der Fibroblasten und Resuspension in Fibroblastenmedium erfolgte die Kultivierung in einer 250 ml Zellkulturflasche bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 6,5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde an Tag drei gewechselt. Fünf Tage nach Aussaat wurden die Zellen bei einer Konfluenz zwischen 70 und 80 % geerntet und aufgeteilt. Hierzu erfolgte zunächst die Zugabe von 3 ml Trypsin, dann ein Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit 10 ml Fibroblastenmedium. Anschließend wurden die Fibroblasten auf acht 6 cm^2 große Zellkulturschalen in jeweils 4 ml Medium verteilt und weitere drei Tage inkubiert. Vor der Stimulation wurden die Zellen fünf Stunden lang in reinem DMEM Medium gestarvt. Danach wurden die Zellen für eine Stunde mit den entsprechenden Konzentrationen an IRAK-4-Inhibitoren (0,1 μM , 1,0 μM , 10 μM) in 2 ml DMEM inkubiert und im Anschluss mit 50 ng/ml IL-1 β ebenfalls in Anwesenheit des IRAK-4 Inhibitors in 2 ml DMEM über Nacht (12-16 h) stimuliert. Nach durchgeführter Zellernte wurden die Zellpellets bis zur RNA-Präparation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.7 Isolation von PBMCs aus Vollblut

PBMCs wurden aus venösem EDTA-Vollblut gesunder Spender isoliert. Hierzu wurde die Ficoll-Hypaque-Methode angewandt, bei der man sich die unterschiedlichen Dichtegrade der einzelnen Zelltypen zunutze macht, um die Zellen zu trennen. Mithilfe dieser Methode können mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, wie Monozyten, T- und B-Zellen sowie natürliche Killerzellen, von anderen Blutzellen wie Erythrozyten oder neutrophilen Granulozyten getrennt werden. Die Arbeitsschritte werden im Folgenden detailliert beschrieben.

Das abgenommene Blut (15 ml, 2 große EDTA-Röhrchen) wurde zunächst im Verhältnis 1:2 mit PBS gemischt. In einem 50 ml Falcon Röhrchen wurden 25 ml dieses Gemischs vorsichtig auf 15 ml *LymphoPrep* geschichtet und anschließend zentrifugiert (2200 U/min, 15 min, RT, ohne Bremse). Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Blutbestandteile hat sich während der Zentrifugation zwischen Serum und Erythrozyten eine PBMC-Bande gebildet, die mit einer 5 ml Pipette abgenommen wurde. Jeweils zwei Banden wurden nach Überführung in ein neues 50 ml Falcon Röhrchen mit PBS + 5 mM EDTA aufgefüllt und zentrifugiert (1600 U/min, 10 min, RT). Nach Absaugen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 1 ml PBS wurde das Falcon erneut mit PBS + 5 mM EDTA aufgefüllt und zentrifugiert (1200 U/min, 10 min). Zur Eliminierung noch vorhandener Erythrozyten wurde das Zellpellet in 1 ml RBC Lysis Puffer resuspendiert und inkubiert (4 min, RT). Danach wurde das Falcon auf 25 ml mit PBS aufgefüllt und anschließend erneut zentrifugiert (1200 U/min, 10 min, RT). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer.

3.1.8 Isolation von CD4⁺ T-Helferzellen

Bei der Isolation von CD4⁺ T-Helferzellen aus PBMCs kamen das *CD4⁺ T Cell Isolation Kit* und der *AutoMACS Pro Separator* zur Anwendung. Die Trennung von CD4⁺ Zellen und nicht-CD4⁺ Zellen erfolgte nach dem Prinzip der magnetischen Zellseparation (MACS), die sich Unterschiede in Oberflächenstrukturen der verschiedenen PBMCs zunutze macht. Monoklonale Antikörper, gekoppelt an magnetische Mikropartikel, sog. MicroBeads, binden hierbei an alle Zelltypen außer die CD4⁺ T-Lymphozyten im Sinne

einer Negativselektion. Die Anlage eines Magnetfeldes führt zur Eliminierung der nicht-CD4⁺ Zellen aus der Probe.

Die PBMCs wurden in MACS-Puffer, bestehend aus PBS, BSA und EDTA, aufgenommen, wobei pro 10⁷ Zellen 40 µl MACS-Puffer und 10 µl *CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail* gegeben wurden. Nach 5-minütiger Inkubation bei 2-8 °C wurden den Zellen weitere 30 µl MACS-Puffer sowie 20 µl *CD4⁺ T Cell MicroBead Cocktail* hinzugegeben. Im Anschluss einer weiteren Inkubationszeit von 10 min bei 2-8 °C wurden die CD4⁺ T-Zellen am AutoMACS Pro Separator der Fa. Miltenyi Biotec mit dem Programm *depletes* magnetisch separiert.

Für das detaillierte Procedere zur Gewinnung der CD4⁺ T-Helferzellen wird auf die Herstellerangaben des *CD4⁺ T Cell Isolation Kit* von Miltenyi Biotec verwiesen.

3.1.9 Stimulation von T-Zellen

Die Gewinnung der T-Lymphozyten erfolgte, wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben, aus PBMCs. Anschließend wurden ca. 150.000 Lymphozyten/Well für 2 bis 3 Tage im 96-Well stimuliert sowie mit IRAK-4 Inhibitoren in den drei Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µM behandelt. Die Stimulation erfolgte zum einen mit α-CD3 in einer Konzentration von 0,75 µg/ml, mit dem eine Stunde vor Zugabe der Lymphozyten die 96-Well Platte „gecoated“ wurde und zum anderen mit α-CD28 (0,75 µg/ml) und IL-1β (0,05 µg/ml), die in die einzelnen Wells zu den T-Zellen pipettiert wurden.

Vor Beginn der Zellernte wurde zunächst der T-Zell-Überstand abgenommen und für folgende ELISA Analysen weggefroren. Anschließend wurde den Zellen 200 µl FACS-Puffer zugegeben. Nach Zentrifugation (2000 U/min, 1 min) wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und zur zytotoxischen Analyse der IRAK-4 Inhibitoren verwendet.

3.1.10 Isolation und Stimulation von neutrophilen Granulozyten aus Vollblut

Zur Isolation neutrophiler Granulozyten wurden zunächst 9 ml EDTA-Blut gesunder Probanden zentrifugiert (2000 U/min, 10 min, RT) und das Plasma verworfen. Dem verbliebenen Blut wurde 4 ml PBS zugegeben. Anschließend wurde das verdünnte

Blut vorsichtig auf 3 ml *LymphoPrep* in einem 15 ml fassenden Falcon Röhrchen geschichtet, ohne die beiden Flüssigkeiten zu vermischen. Durch Zentrifugation bei 2000 U/min und RT für 20 min ohne Bremse erfolgte die Separation von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*) (obere Bande) und den Erythrozyten und Granulozyten (untere Bande). Nach Verwerfen der PBMC-Schicht wurden die restlichen Zellen mit 8 ml PBS verdünnt. Die Trennung von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten wurde über die Zugabe von 1,5 ml 20 %iger Dextran Lösung initiiert. Nach einer Inkubation von 25 bis 30 min wurde der rötliche Neutrophilen-haltige Überstand abgenommen, in ein neues 15 ml Falcon Röhrchen überführt, mit 14 ml PBS aufgefüllt und zentrifugiert (2000 U/min, 10 min, RT). Die Eliminierung verbliebener Erythrozyten erfolgte über die Behandlung des neutrophilen Zellpellets mit 5 ml RBC (red blood cell) Lysis Puffer für 2 min. Nach Abstoppen der Lyse mit 14 ml PBS und erneuter Zentrifugation (2000 U/min, 10 min, RT) wurden die neutrophilen Zellen in 5 ml T-Zell-Medium resuspendiert und wie in Kapitel 3.1.3 gezählt.

Vor Stimulation erfolgte die Präinkubation mit 100 ng/ml GM-CSF für 1 h. Anschließend wurden die Zellen, gelöst in T-Zell-Medium, auf 24-Well-Platten (ca. 4×10^6 Zellen/Well) ausgesät. Die Inkubation erfolgte für 24 h nach Zugabe von 500 μ l T-Zell-Medium mit jeweils 10 μ M des entsprechenden IRAK-4 Inhibitors + 100 ng/ml Stimulanz (LPS, IL17c) + 5 % HS (Humanserum) mit 50 ng/ml GM-CSF. Vor Initiierung der Zellernte am nächsten Tag wurden 700 μ l Überstand für die Durchführung zukünftiger ELISA-Analysen geerntet und bei -80 °C gelagert. Die jeweils restlichen 300 μ l wurden im Verhältnis 1:1 mit kaltem PBS gemischt, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und die Zellsuspensionen in Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (1200 U/min, 4 °C, 10 min) wurden die Zellpellets bis zur RNA-Präparation bei -80 °C gelagert.

3.1.11 Migrationsassay von neutrophilen Granulozyten mit Keratinozytenüberständen

Zur Untersuchung des chemotaktischen Potentials von Keratinozyten auf neutrophile Granulozyten nach IRAK-4 Inhibierung wurde ein Migrationsassay durchgeführt. Beim Migrationsassay wird eine zu testende Flüssigkeit in die untere Kammer einer Trans-

wellplatte vorgelegt und von neutrophilen Granulozyten durch eine Membran mit definierter Porengröße getrennt. Die Porengröße wird so gering gewählt, dass die Neutrophilen nur durch aktive Migration hindurchpassen. Die Durchführung der Migrationsexperimente erfolgte durch Manja Jargosch.

In der vorliegenden Arbeit handelte es sich bei dem Testserum um einen Zellkulturüberstand von Keratinozyten nach IRAK-4 Inhibierung und Flg-Stimulation, dessen Gewinnung in Kapitel 3.1.4 beschrieben wurde. IL-8 anstelle des Keratinozytenüberstands diente als Positivkontrolle. Je 32 µl des Überstandes wurden pro Vertiefung in ein aus 96 Wells bestehendes *ChemoTx® Disposable Chemotaxis System* pipettiert. Nach Aufsetzen der Filtermembran mit einem Porendurchmesser von 5 µm wurden pro Well 20 µl neutrophile Granulozyten (entspricht ca. 30.000 Zellen), gelöst in 1 % T-Zell-Medium, aufgebracht und der Testansatz für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend wurden die transmigrierten Zellen durch Zentrifugation (500 g, 1 min, RT) in der unteren Kammer gesammelt, zu je 20 µl in FACS-Tubes überführt und in 150 µl FACS-Puffer gelöst.

Die Analyse der migrierten Zellen erfolgte mittels eines *LSRFortessa* Durchflusszytometers (BD Biosciences). Dabei wurden alle Zellen über einen Zeitraum von 45 Sekunden im Modus „high“ aufgenommen, um vergleichbare Daten zu generieren. Über ein FSC- und SSC-Dot-Plot wurde ein Gate auf die Neutrophilen-Population gesetzt. Die Anzahl der migrierten neutrophilen Zellen innerhalb dieses Gates wurden in Relation zur unbehandelten stimulierten Probe gesetzt. Insgesamt wurden die Keratinozytenüberstände von vier Spendern analysiert. Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung.

3.1.12 Gewinnung von läSIONALEM T-Zell-Überstand aus Hautbiopsien

Läsionale T-Zellen produzieren einen Mix aus inflammatorischen Zytokinen, die ein spezifisches dermatologisches Krankheitsbild induzieren. Im Verlauf der Laborphase wurde läSIONALER T-Zell-Überstand zur Stimulation von Keratinozyten verwendet, um krankheitsspezifische Veränderungen im 3D-Modell zu induzieren. Grundlage für die

Gewinnung des T-Zell-Überstandes waren Vollhautbiopsien fünf verschiedener Patienten mit atopischem Ekzem aus der Biobank Biederstein. Folgende Arbeitsschritte wurden, vereinfacht dargestellt, von Jana Sänger durchgeführt:

Die Biopsie wurde auf eine 24-Well-Platte in T-Zell-Medium überführt. Durch Zugabe von IL-2 (60 U/ml) wurden die T-Zellen zur Auswanderung aus der Biopsie in das umliegende Medium angeregt. Nach 1-2 Wochen wurden die ausgewanderten läsionalen T-Zellen bei einer Konfluenz von 30 bis 50 % in ein neues Well überführt, für weitere zwei Wochen über Stimulation mit α -CD3 und α -CD28 expandiert und anschließend in Flüssigstickstoff weggefroren.

Zur Gewinnung von läsionalem T-Zell-Überstand wurden die Zellen aufgetaut, erneut mit α -CD3 und α -CD28 für zwei Tage im 24-Well stimuliert und im Anschluss für zwei Wochen in Anwesenheit von 60 U/ml IL-2 expandiert. In dieser Zeit wurde die Zellpopulation von einem Well auf ca. 16 bis 32 Wells vergrößert. Anschließend erfolgte die Zellernte, erneute Aussaat und Stimulation mit α -CD3 und α -CD28 für weitere drei Tage. Der entstandene Überstand wurde geerntet und bis zur weiteren Verwendung weggefroren. Die Konzentration von IL-4, IL-13, IL-22, IL-6, TNF- α und IFN- γ wurde mittels ELISA bestimmt. Die Zusammensetzung des läsionalen T-Zell-Überstand-Mix fünf verschiedener Biopsien von Patienten mit atopischem Ekzem ist Abbildung 6 zu entnehmen.

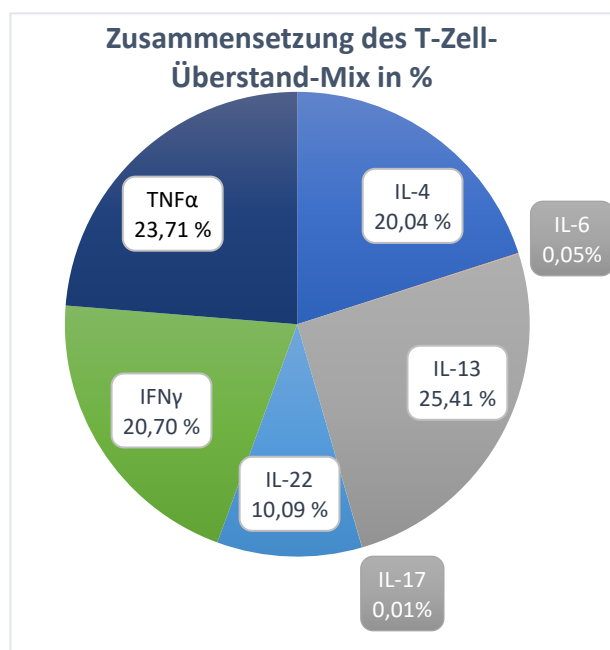


Abbildung 6: Relative Zusammensetzung des läsionalen T-Zell-Überstand-Mix von 5 Patienten mit atopischem Ekzem

3.1.13 Inkubation läsionaler Hautbiopsien mit IRAK-4 Inhibitoren

Biopsien mit einem Durchmesser von 6 mm wurden aus läsionalen Hautarealen von Patienten mit atopischem Ekzem oder Psoriasis entnommen und anschließend *in-vitro* stimuliert. Gemessen wurde der Einfluss der IRAK-4 Inhibitoren auf die Genexpression verschiedener Zielgene.

Dafür wurde die Biopsie geviertelt und in T-Zell-Medium + 1 % HS für 4 h mit 100 µM des jeweiligen IRAK-4 Inhibitors stimuliert. Im Anschluss der Stimulation wurden die zerteilten Biopsien in RNAlater überführt und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

3.2 RNA-Isolation

Für die Durchführung von Genexpressionsanalysen wurde aus den kultivierten Zellen und Hautbiopsien Gesamt-RNA isoliert. Der Arbeitsplatz wurde im Vorfeld mit *RNAse-Zap*® gereinigt, einer Lösung zur Oberflächendekontamination, die RNasen bei Kontakt zerstört. Die Isolation erfolgte mit Hilfe verschiedener Kits gemäß Herstellerangaben.

Die Quantität und Qualität der gewonnenen RNA wurde im Anschluss mit einem Photospektrometer (*NanoDrop*) bestimmt.

3.2.1 RNA-Isolation aus kultivierten Zellen

Zur Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen wurde das *InviTrap Spin Universal RNA Mini Kit (Stratec Biotechnology)* genutzt und der Bedienungsanleitung entsprechend gearbeitet.

Zunächst wurden die Zellen durch Zugabe einer Lösung aus DTT und *Lysis Solution TR* lysiert. Um die DNA zu eliminieren, wurde die gesamte Lösung auf einen DNA-bindenden Filter aufgetragen und anschließend zentrifugiert (1 min, 11.000 U/min). Nach Zugabe von 70 %-igem Ethanol wurde die Probe auf einen *RNA-RTA Spin Filter* aufgetragen und erneut zentrifugiert (2 min, 11.000 U/min), wobei die RNA an dieser Stelle auf dem Filter haften blieb. Um jegliche Rückstände – bis auf die RNA – aus dem Filter zu entfernen, folgten ein Waschschriff mit Waschpuffer R1 sowie zwei Waschschriffe mit Waschpuffer R2, jeweils mit anschließender Zentrifugation (1 min,

11.000 U/min). Zur Eliminierung übrig gebliebener Reste von Ethanol wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (4 min, max. U/min). Zum Schluss wurde die RNA mit 40 µl Elutionspuffer R durch Zentrifugation (1 min, 11.000 U/min) eluiert. Die RNA wurde sofort auf Eis gelagert und ihre Konzentration am *NanoDrop* gemessen. Die RNA wurde bis zur nachfolgenden cDNA-Synthese auf Eis gelagert und im Anschluss bei -80 °C eingefroren.

3.2.2 RNA-Isolation aus Hautbiopsien

Für die RNA-Isolation aus den Hautproben wurde das *miRNeasy Mini Kit* verwendet. Gemäß Herstellerangaben wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Zunächst wurde die Biopsie in ein Mikroreaktionsgefäß (2 ml) mit 700 µl *QIAzol Lysis Reagenz* überführt. Mithilfe einer Schere wurde die Biopsie manuell in kleine Stücke zerteilt, bevor anschließend der *TissueLyser* (Qiagen) zur endgültigen Homogenisierung der Probe eingesetzt wurde (2 x 5 min, 23/s). Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde der Probe 140 µl Chloroform zugesetzt, die Suspension für 15 Sekunden gut gemischt und für weitere 2 bis 3 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (15 min, 12.000x g, 4 °C), bei der sich die Probe in drei Phasen separierte: eine obere wässrige RNA-haltige Phase, eine weiße Phase in der Mitte sowie eine untere, rote organische Phase.

Die obere RNA-haltige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 525 µl Ethanol (100 %) gefällt. 700 µl der Probe wurden auf eine *RNeasy Mini spin column* pipettiert und zentrifugiert (15 s, 10.000 U/min, RT). Zur Eliminierung verbliebener DNA wurden zunächst 350 µl RWT-Puffer auf die *RNeasy Mini spin column* pipettiert und zentrifugiert (15 s, 10.000 U/min, RT). Der DNA-Verdau erfolgte durch Zugabe von 10 µl DNase + 70 µl RDD-Puffer bei einer Inkubationszeit von 15 min bei RT. Nach Zugabe von 350 µl RWT-Puffer wurde erneut zentrifugiert (15 s, 10.000 U/min, RT) und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden zur Reinigung der Filtermembran 500 µl RPE Puffer auf die *RNeasy Mini spin column* pipettiert und zentrifugiert (15 s, 10.000 U/min, RT). Dieser Schritt wurde zur vollständigen Trocknung der Filtermembran mit einer Zentrifugationszeit von 2 min wiederholt. Eluiert wurde die RNA in 28 µl RNase freien Wassers, für 5 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 10.000 U/min, RT). Die RNA wurde bis zur nachfolgenden cDNA-Synthese auf Eis gelagert und im Anschluss bei -80 °C eingefroren.

3.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des *High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*. 500 ng RNA wurden mit RNase freiem Wasser auf 14,2 µl aufgefüllt und mit 5,8 µl Reaktionsmischung gemischt. Die einzelnen Reaktionsschritte sowie -bestandteile sind den Tabellen 14 und 15 zu entnehmen.

Tabelle 13: Reaktionsschritte der cDNA-Synthese

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1	25 ° C	10 min
2	37 ° C	120 min
3	85 ° C	5 min
4	4 ° C	∞

Tabelle 14: Reaktionsbestandteile der cDNA-Synthese

Substanz	V [µl]
10x RT Buffer	2,0
10x RT Random Primers	2,0
25x dNTP Mix [100 mM]	0,8
Reverse Transkriptase [50 U/µl]	1,0
RNA	500 ng
RNase-freies Wasser	ad 20,0

3.4 Bioanalytische Nachweisverfahren

3.4.1 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die Genexpression der verschiedenen Zielgene wurde mit Hilfe von qRT-PCR-Messungen analysiert. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR bietet sich hier die Möglichkeit, die amplifizierten DNA-Abschnitte in Echtzeit zu quantifizieren. Über die Detektion emittierter Fluoreszenz – hier der Farbstoff SYBR-Green, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert – kann auf die Menge der PCR-Produkte geschlossen werden.

Die qRT-PCR wurde mit einem Volumen von 10 µl pro 384-Well durchgeführt, wobei jeweils 3,4 µl 1:10 verdünnte cDNA (entspricht 8,5 ng/Rkt.) und 6,6 µl *FastStart Universal SYBR-Green Master* mit einem Mix aus zielgenspezifischen Vorwärts- und

Rückwärtsprimern vermischt wurden (s. Tab. 16.). Das Thermoprofil der PCR ist in Tabelle 17 dargestellt.

Substanz	Arbeitskonzentration	V [μ l]
2x FastStart Universal SYBR-Green Master (Rox)	1x	5,0
for Primer [4 μM]	0,32 μ M	0,8
rev Primer [4 μM]	0,32 μ M	0,8
1:10 cDNA	8,5 ng/384-Well	3,4

Tabelle 15: Arbeitskonzentrationen und eingesetzte Volumina der PCR-Substanzen

	Temperatur	Dauer	
Initiierung	50 °C	2 min	
	95 °C	10 min	
Amplifikation	95 °C	15 sek	40x
	60 °C	1 min	
Schmelzkurve	95 °C	15 sek	
	60 °C	1 min	
	95 °C	15 sek	

Tabelle 16: Protokoll real-time PCR

Die relativen Expressionswerte wurden mithilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode zur unbehandelten stimulierten Probe als Referenz bestimmt. Hierbei werden zunächst die Ct-Werte von Zielgen und Housekeeper-Gen 18S voneinander abgezogen ($\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Housekeeper}}$), um dann die Differenz zwischen zwei Ct-Werten innerhalb eines Zielgens zu bilden ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Referenz}}$). Dieser Wert kann in folgende Gleichung eingesetzt werden: n-fache Expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.4.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht den Nachweis von extra- und intrazellulären Proteinen. Eine genaue Bestimmung des Zelltyps ist durch Markierung von Oberflächenrezeptoren mit Fluoreszenzfarbstoffen möglich. In der vorliegenden Arbeit erfolgte hierüber neben der Bestimmung migrierter neutrophiler Granulozyten im Transwellassay die Differenzierung von vitalen und toten T-Lymphozyten nach Behandlung mit IRAK-4 Inhibitoren durch Zugabe von DAPI. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nur

durch die Membran von toten Zellen penetriert und diese durch Interkalation in doppelsträngige DNA anfärbt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am FACS-Gerät *BD LSRFortessa* der Firma BD Biosciences. Vor der Messung wurde den Proben jeweils 1 µl DAPI hinzugegeben, um tote Zellen über Interkalation mit der DNA anzufärben.

Über den FSC („Forward scatter“) und SSC („Side scatter“) wurde auf die Lymphozyten „gated“. Danach wurden die Dubletten mithilfe des FSC-H und FSC-W ausgeschlossen und zum Schluss die Frequenz der toten Zellen anhand der DAPI-Fluoreszenz bestimmt.

3.4.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wird genutzt, um in Zellkulturüberständen befindliche Zytokine quantitativ nachzuweisen. Das jeweils zu messende Zytokin reagiert zunächst mit dem sog. Primärantikörper (*capture antibody*), der über seinen Fc-Teil am Boden einer 96-Well-Mikrotiterplatte anheftet. Ein weiterer, enzymgekoppelter Antikörper, der sog. *detection antibody* bindet ebenfalls an das gesuchte Zytokin und fungiert als Katalysator für eine Farbreaktion. Die Quantität des Farbstoffes wird photometrisch gemessen und ist proportional der Konzentration des gesuchten Zytokins. Die absolute Konzentration kann mithilfe einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen bestimmt werden.

Gemäß Anweisungen des Herstellers wurde folgendes Arbeitsprotokoll, verkürzt dargestellt und je nach Zytokin in leicht abgewandelter Form, angewandt:

In jede Vertiefung einer 96-Well-Platte wurden 50 µl des *capture antibody* pipettiert und über Nacht je nach Zytokin entweder bei Raumtemperatur oder bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte ein Waschvorgang mit 400 µl PBS-Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween) im *TECAN HydroSpeed Washer*. Danach wurde auf die Wells jeweils 300 µl Blockierlösung (*Assay Diluent*) zur Sättigung unspezifischer Bindungen pipettiert und für 1 h inkubiert. Nach dem erneuten Durchlauf des o.g. Waschprogramms wurden 50 µl der Standard-, Proben- und Kontrolllösungen auf die Platte aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Dabei wurden die Probenlösungen je nach gemessenem Zytokin unterschiedlich stark verdünnt (s. Tab. 16).

Tabelle 17: Verdünnungen der analysierten T-Zell-Überstände im ELISA in Abhängigkeit des zu messenden Zytokins

Gemessenes Zytokin	Verdünnung des T-Zell-ÜS
IL-4	1:2
IL-17A	1:2,5
IL-22	1:2
IFN- γ	1:100
TNF- α	1:100

Nach wiederholtem Waschgang folgte der *Detection Antibody*, der nur spezifische Antigene des gesuchten Zytokins erkennt. Dieser Antikörper wurde zusammen mit Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*) für 1 h bei RT auf der Mikrotiterplatte belassen (50 μ l/Well). Anschließend wurde erneut gewaschen und danach jeweils 50 μ l TMB-Substratlösung in jedes Well gegeben. Die TMB-Substratlösung setzte sich zusammen aus:

Tabelle 18: Zusammensetzung und Mengenangaben der TMB-Substratlösung zur Inkubation einer 96-Well-Platte

Substrat	Menge (μ l)
Citrat-Puffer	5500
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	2,55
Tetramethylbenzidin (TMB)	55

Bei ausreichend starker Blaufärbung der Proben wurde die Farbreaktion mit 50 μ l Schwefelsäure abgestoppt und die Mikrotiterplatte bei einer bestimmten Wellenlänge am ELISA-Reader ausgewertet.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der integrierten Analysefunktion des Programms *Prism 9 (GraphPad Software)*. Es wurden für die unstimulierte Probe und stimulierte Probe allein sowie in Verbindung mit den verschiedenen Inhibitorkonzentrationen Streuungs- und Balkendiagramme mit Fehlerbalken erstellt. Verbildlicht wurden dabei Mittelwert +/- Standardabweichung. Zum Nachweis der statistischen Signifikanz der Inhibitorwirkung wurden die Einzelergebnisse der verschiedenen Inhibitorkonzentrationen im ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur gegenüber den je nach Versuchsaufbau unstimulierten oder stimulierten Kontrollproben überprüft.

P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet, wobei die zugrunde gelegten Signifikanzniveaus im Ergebnispart unter den jeweiligen Abbildungen aufgeführt werden.

4 Ergebnisse

Untersucht wurde der konzentrationsabhängige Einfluss dreier IRAK-4 Inhibitoren (I1, I2 und I3) auf verschiedene Zelltypen, die an der Pathogenese bzw. Aufrechterhaltung von entzündlichen Hauterkrankungen beteiligt sind. Der Fokus lag dabei auf primären humanen Keratinozyten, dermalen Fibroblasten, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen.

4.1 IRAK-4 Initiation in primären Keratinozyten

Als Produzenten einer Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren kommt den Keratinozyten neben ihrer mechanischen Barrierefunktion auch eine wichtige Rolle in der Steuerung von Immunprozessen zu. Über die Detektion von PAMPs und anschließende Einleitung proinflammatorischer Signalkaskaden stellen sie neben den klassischen Immunzellen einen integralen Bestandteil der dermalen Immunantwort dar.

4.1.1 Flagellin induziert über Aktivierung des IRAK-4-Signalweges die Expression proinflammatorischer Gene in Keratinozyten

Um regulative Effekte der untersuchten IRAK-4 Inhibitoren nachweisen zu können, musste zunächst die Signalkaskade, an deren Ablauf IRAK-4 mit ihrer Kinaseaktivität beteiligt ist, aktiviert werden. So erfolgte zu Beginn der experimentellen Laborphase die Suche nach einem geeigneten IRAK-4 Trigger mit entzündungsfördernden Eigenschaften. Ausgewählt wurden IL-1 β sowie LPS, FLG und IMQ als TLR-Liganden, vier Triggersubstanzen proinflammatorischer Prozesse des angeborenen Immunsystems.

Nach Stimulation der einschichtigen Keratinozyten mit jeweils einem der vier Trigger wurde das Aktivitätslevel bestimmter Zielgene mittels qPCR evaluiert. Als Zielgene wurden solche gewählt, die für chemotaktische Faktoren (*CXCL5*), antimikrobielle Defensine (*DEFB4*), Zytokine (*IL19*) sowie Strukturproteine (*LCE3A*) codieren und eine relevante Funktion in der Pathogenese entzündlicher Prozesse übernehmen.

Das bakterielle Protein Flagellin (FLG) induzierte bei drei der vier gemessenen Gene die stärksten Expressionsanstiege (vgl. Abb. 7).

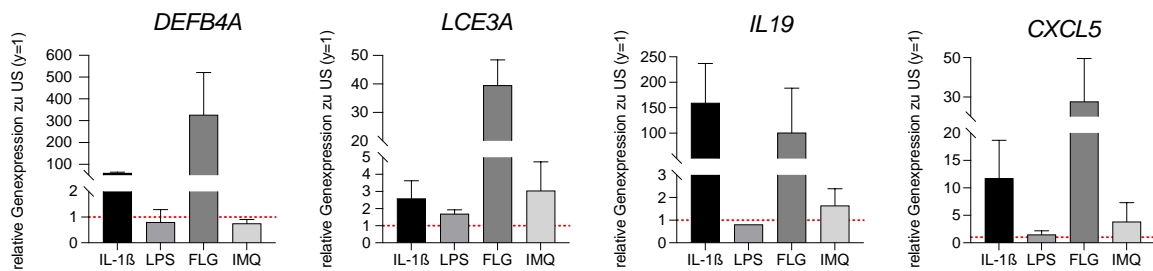


Abbildung 7: Bakteriellies Flagellin (FLG) induziert einen starken Expressionsanstieg proinflammatorischer Gene in Keratinozyten

Abgebildet sind die relativen Genexpressionswerte in Bezug zur unstimulierten Probe. N=2. Abk: IL-1β: Interleukin-1β, LPS: Lipopolysaccharide, FLG: Flagellin, IMQ: Imiquimod

Die stärksten Effekte wurden für die Gene *DEFB4A* und *IL19* beobachtet, mit einer Steigerung der Expressionswerte um das 300- (*DEFB4A*) bzw. 100-fache (*IL19*) im Vergleich zur unstimulierten Probe. Ebenfalls starke Effekte zeigten sich für die Expressionswerte von *LCE3A* und *CXCL5*, bei denen der Anstieg im Bereich des 30 bis 40-fachen lag. IL-1β induzierte vergleichbar starke Effekte wie FLG für die Gene *DEFB4A* und *IL19* sowie moderate Anstiege der Expressionslevel von *CXCL5* und *LCE3A*. Im Vergleich dazu waren nach Zugabe von LPS und IMQ deutlich geringere bis gar keine Effekte messbar. Hier lagen die beobachteten Genexpressionswerte im Bereich der unstimulierten Probe. In den folgenden Experimenten zur Evaluierung der Wirkung der getesteten IRAK-4 Inhibitoren wurde diesen Ergebnissen entsprechend FLG als Stimulans eingesetzt.

4.1.2 Signifikante Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Defensinen durch IRAK-4 Inhibition in Keratinozyten

Ein erster Nachweis regulativer Eigenschaften der getesteten niedermolekularen Inhibitoren erfolgte ebenfalls an einschichtigen Keratinozyten im Rahmen von Genexpressionsanalysen.

Es wurden die Aktivitätslevel sechs verschiedener Markergene von atopischem Ekzem und Psoriasis in Keratinozyten nach Inhibierung von IRAK-4 und Stimulation mit FLG ausgewertet. Die Genexpression wurde jeweils in Relation zu der mit FLG stimulierten Probe betrachtet, um den regulativen Effekt der IRAK-4 Inhibitoren bewerten zu können. Die Ergebnisse der PCR zeigen, dass der stimulierende Effekt von FLG auf

die einzelnen Gene durch die IRAK-4 Inhibitoren gehemmt wurde. Die Expressionswerte wurden zum Teil signifikant gesenkt, wobei trotz dreier Verdünnungsstufen [0,1 μ M; 1,0 μ M; 10 μ M] keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden konnte (s. Abb. 8). Mit Ausnahme von *LCE3A* konnte für alle Zielgene eine Expressionsminderung auf unterschiedlichen Signifikanzniveaus im Vergleich zur stimulierten Probe erzielt werden. Inhibitor 1 (I1) zeigte signifikante Wirkungen in den Konzentrationen 1 und 10 μ M mit einer Verringerung der Genexpressionslevel von *CXCL5*, *CXCL8*, *DEFB4A* und *S100A7* um 50 bis 75 % im Vergleich zu FLG, während für die geringste Konzentration (0,1 μ M) keine eindeutigen Effekte nachweisbar waren. Inhibitor 2 (I2) entfaltete maximale Wirkung in der höchsten Konzentration (10 μ M) und senkte die Expressionslevel der Gene *CXCL5*, *CXCL8*, *DEFB4A*, *S100A7* und *IL19* um 60 bis 85 %, verglichen mit FLG. Inhibitor 3 (I3) zeigte vergleichbare Effekte wie die Inhibitoren 1 und 2, wobei hier die Konzentrationen 0,1 μ M und 10 μ M der mittleren Konzentration überlegen waren.

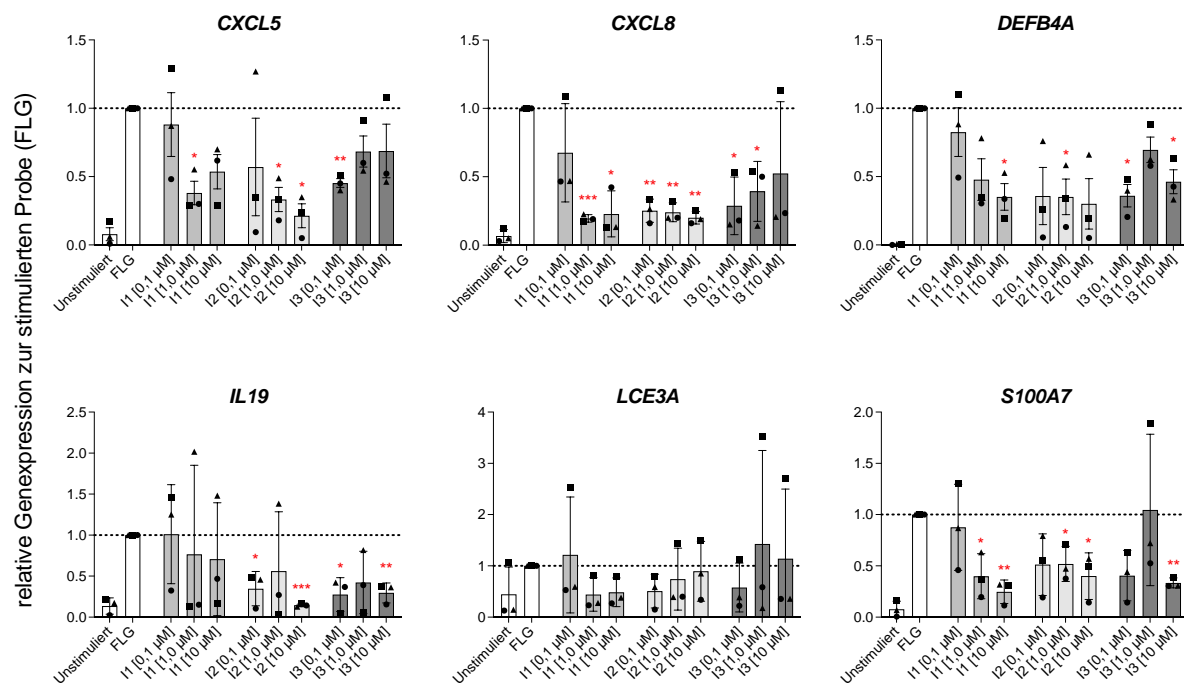


Abbildung 8: Inhibition von IRAK-4 in humanen Keratinozyten reduziert Genexpression von Zytokinen, chemotaktischen Faktoren und antimikrobiellen Peptiden.

Die Keratinozyten wurden für 1 h mit den IRAK-4 Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen inkubiert und anschließend mit 100 ng/ml FLG in Anwesenheit des entsprechenden IRAK-4 Inhibitors ü.N. stimuliert. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. N=3. Abk: FLG: Flagellin, I1: Inhibitor 1, I2: Inhibitor 2, I3: Inhibitor 3

4.1.3 IRAK-4 Inhibition im 3D-Keratinocyten-Modell neutralisiert proinflammatorische Effekte nach Stimulation mit läSIONalem T-Zell-Überstand von Patienten mit atopischem Ekzem

Stellvertretend für die menschliche Epidermis und damit als Annäherung an physiologische *in-vivo* Rahmenbedingungen wurde ein 3D-Keratinocyten-Modell unter Ausbildung verschiedener Zellschichten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien (s. Abb. 4 im Methodenpart) kultiviert, anhand dessen die Wirksamkeit der IRAK-4 Inhibitoren weiter evaluiert wurde. Um dem pathophysiologischen Krankheitsmodell gerechter zu werden, erfolgte die Stimulation des 3D-Modells im Unterschied zur einschichtigen Zellkultur mit Zellkulturüberstand, der aus läSIONalen T-Zellen von Hautbiopsien unterschiedlicher Patienten mit atopischem Ekzem (AE) gewonnen wurde. Die IRAK-4 Inhibitoren kamen in einer Konzentration von 10 µM zur Anwendung. Die Stimulation mit T-Zell-Überstand (TCS) induzierte die Genexpression von *DEFB4A*, *IL19*, *LCE3A*, *S100A7*, *CXCL8* und *IL23*, während für die Gene *IL33* und *TSLP* eine Reduktion und für *CXCL5* sowie *TNF* kein Anstieg im Vergleich zur unstimulierten Probe beobachtet wurde (s. Abb. 9). Die Zugabe der IRAK-4 Inhibitoren 1 bis 3 führte teilweise zur signifikanten Neutralisierung der Expressionwerte zurück auf das Niveau der unstimulierten Probe.

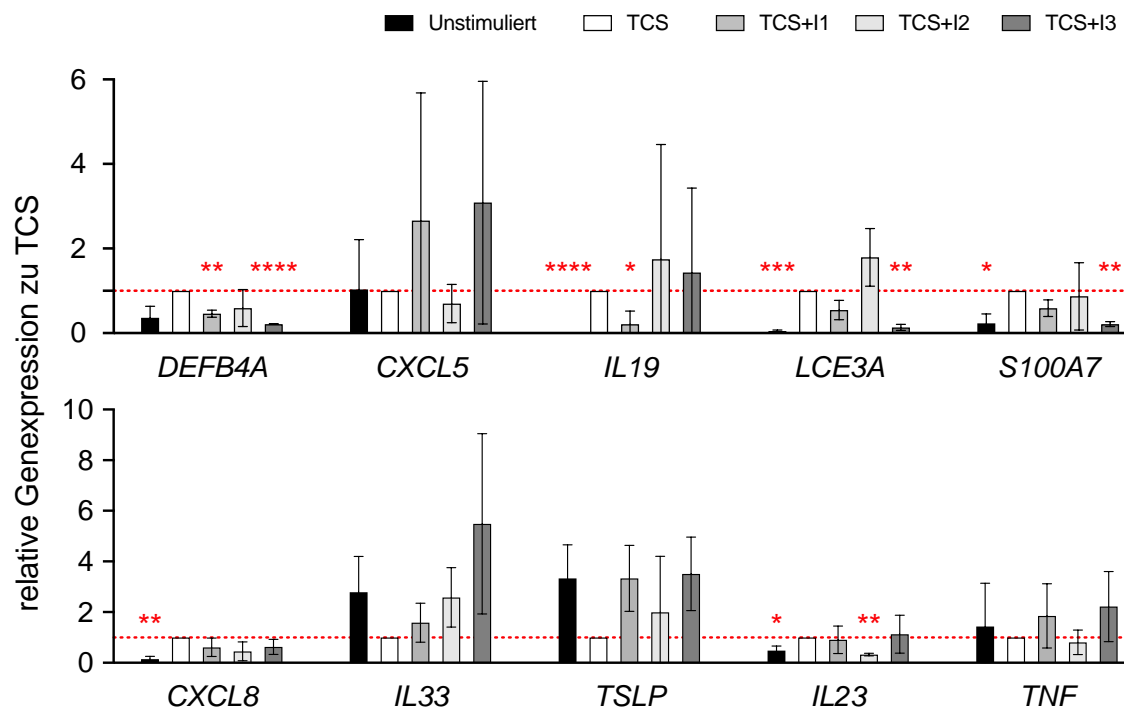


Abbildung 9: IRAK-4 Inhibitoren neutralisieren die Expression proinflammatorischer Gene im 3D-Modell nach Stimulation mit T-Zell-Überstand (TCS) von Patienten mit atopischem Ekzem.

Die Keratinozyten wurden für 1 h mit den IRAK-4 Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen inkubiert und anschließend mit 100 µl/ml AE-TCS-Mix in Anwesenheit des entsprechenden IRAK-4 Inhibitors für 24 h stimuliert. Signifikanzniveaus: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. N=3. Abk: TCS: T-Zell-Überstand

So hemmte I1 signifikant die Expression von *DEFB4A* und *IL19* um mindestens 50 % sowie moderat, aber nicht signifikant von *LCE3A*, *S100A7* und *CXCL8* um 30-50 %. I2 regulierte *IL23* mit >60 % signifikant herunter und zeigte moderaten Einfluss auf die Expressionswerte von *DEFB4A* und *CXCL8*. Die Behandlung mit I3 hatte eine signifikante Reduktion von *DEFB4A*, *LCE3A* und *S100A7* zur Folge (>75 %), während *CXCL8* moderat, aber nicht signifikant gehemmt wurde. Alle drei Inhibitoren neutralisierten zudem nicht signifikant den herabregulierenden Effekt des TCS auf die Genexpressionswerte von *IL33* und *TSLP*.

4.2 IRAK-4 Inhibition in primären neutrophilen Granulozyten

Neben der Aktivierung von Keratinozyten erfolgt im Rahmen entzündlicher Prozesse der Haut, insbesondere bei der Psoriasis, bereits in sehr frühen Stadien die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Als Mediatoren weiterer proinflammatorischer Vorgänge stellen sie eine interessante Zielstruktur für die IRAK-4 Inhibitoren dar. Deren

hemmender Einfluss wurde auf chemotaktisches Potenzial, Zytokinproduktion und Genexpression getestet.

4.2.1 IRAK-4 Inhibition in Keratinozyten reduziert das chemotaktische Potential auf neutrophile Granulozyten

Um einen indirekten, chemotaktischen Einfluss der IRAK-4 Inhibitoren auf neutrophile Granulozyten beurteilen zu können, wurde deren Migrationsverhalten in Anwesenheit von Zellkulturüberständen humaner Keratinozyten, behandelt mit den IRAK-4 Inhibitoren und stimuliert mit FLG, getestet. Verglichen wurde das Migrationsverhalten auf den Keratinozytenüberstand, der ausschließlich mit FLG stimuliert wurde. Als Positivkontrolle diente Interleukin-8 (IL-8) in Konzentrationen von 5 ng und 50 ng, dessen chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten bekannt ist (Baggiolini und Clark-Lewis 1992). Als Kontrollprobe wurde PBS ohne chemotaktischen Stimulus eingesetzt, um die Anzahl spontan migrierender Zellen zu ermitteln. Die quantitative Bestimmung transmigrierter Granulozyten erfolgte am FACS-Gerät.

Der unter Stimulation mit FLG produzierte Keratinozytenüberstand hatte verglichen mit der unstimulierten Probe eine Verdopplung der Neutrophilenmigration zur Folge. Unter Einfluss der IRAK-4 Inhibitoren 1 bis 3 (10 μ M) sank das chemotaktische Potenzial des Überstandes deutlich, was sich in einer signifikanten Reduktion migrierter Granulozyten zeigte (s. Abb. 10). I2 und I3 erwiesen sich dabei als potenteste Hemmstoffe, die mit einer Reduktion um ca. 50 % im Bereich der unstimulierten Probe lagen. I1 führte zu einer nicht signifikanten Reduktion um etwa 20 %.

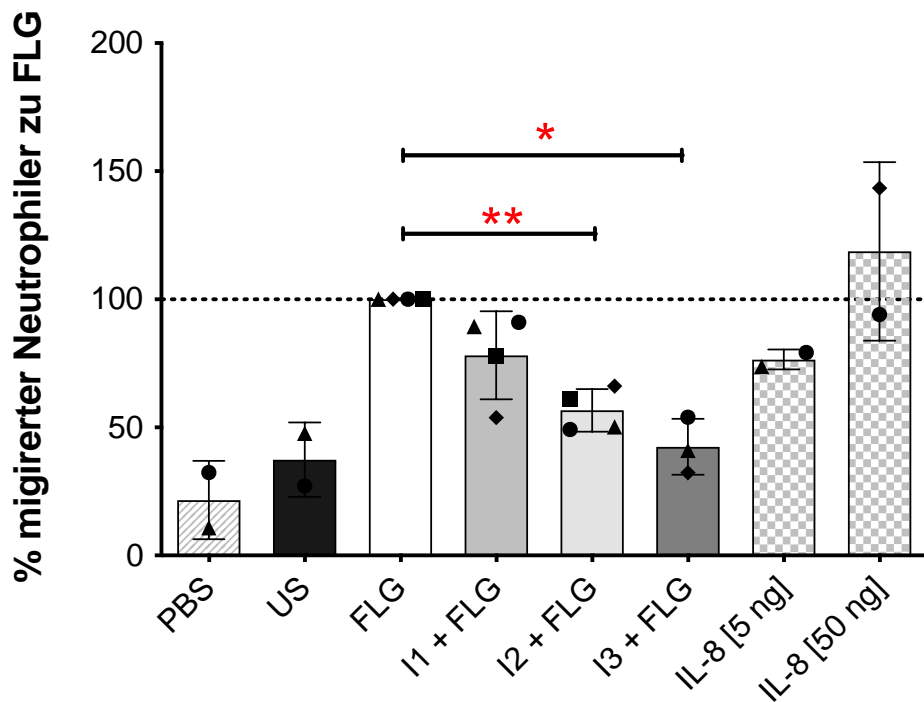


Abbildung 10: IRAK-4 Inhibition in humanen Keratinozyten reduziert chemotaktische Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Pro Well wurden 30.000 neutrophile Granulozyten für zwei Stunden mit 32 μ l Keratinozytenüberstand inkubiert. Nach Lösung der transmigrierten Zellen in FACS-Puffer wurde deren Anzahl durch FACS-Analyse ermittelt. Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. N=4 (I1, I2), N=3 (I3). Abk: PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, US: Unstimuliert, FLG: Flagellin, IL-8: Interleukin 8

4.2.2 IRAK-4 Inhibition verringert Proteinausschüttung und Genexpression neutrophiler Granulozyten

Um den direkten Effekt einer IRAK-4 Inhibition auf neutrophile Granulozyten zu testen, wurden periphere neutrophile Zellen mit 100 ng LPS (Aktivator von TLR-4) \pm 10 μ M IRAK-4 Inhibitor für 24 h inkubiert. Die Stimulation wurde von Manja Jargosch durchgeführt.

Der Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA von Jana Sänger auf das Vorhandensein verschiedener Zytokine analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von IRAK-4 in neutrophilen Granulozyten eine Aktivitätsabnahme zur Folge hat, die sich durch verminderte Ausschüttung der proinflammatorischen Proteine IL-1 β , Myeloperoxidase (MPO) und IL-6 auszeichnet. Inhibitor 1 führte bei allen drei quantifizierten Proteinen zu einer signifikanten Verminderung ihrer Ausschüttung um 30 bis 50 %. Inhibitor 2 zeigte lediglich auf die Ausschüttung von IL-6 hemmende Eigenschaften,

wohingegen IL-1 β und MPO unbeeinflusst blieben. Inhibitor 3 reduzierte die Konzentration von IL-1 β um mehr als 60 % im Vergleich zur LPS-stimulierten Probe und hemmte die Ausschüttung von IL-6 sowie MPO ebenfalls signifikant um 30 bis 50 % (vgl. Abb. 11).

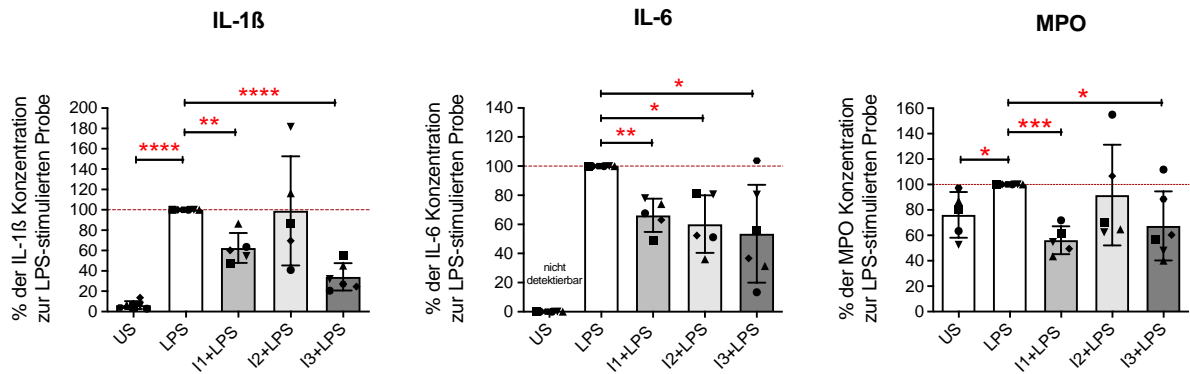


Abbildung 11: IRAK-4 Inhibitoren hemmen Ausschüttung von Zytokinen und MPO in neutrophilen Granulozyten

Signifikanzniveaus: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001; N = 5 (I1 and I2); N = 6 (I3). Abk.: US, Unstimuliert; LPS, Lipopolysaccharide

Eine Genexpressionsanalyse der behandelten und stimulierten neutrophilen Granulozyten wurde mittels PCR durchgeführt. Die Ergebnisse in Abb. 12 zeigen, dass die Behandlung mit Inhibitor 1 und 3 zu einer signifikant verringerten Genexpression von *IL1b* und *IL6* führten, wohingegen Inhibitor 2 keinen hemmenden Effekt zeigte. Auf die Expression von *PRTN3* (Proteinase 3) zeigte nur Inhibitor 1 einen signifikant induzierenden Einfluss. Die Messungen folgender weiterer Gene haben für alle drei Inhibitoren aufgrund hoher Standardabweichungen keine aussagekräftigen Resultate ergeben, sodass sie in der Abbildung nicht berücksichtigt wurden: *TNF*, *MPO*, *S100A8*, *S100A9* und *IL17C*.

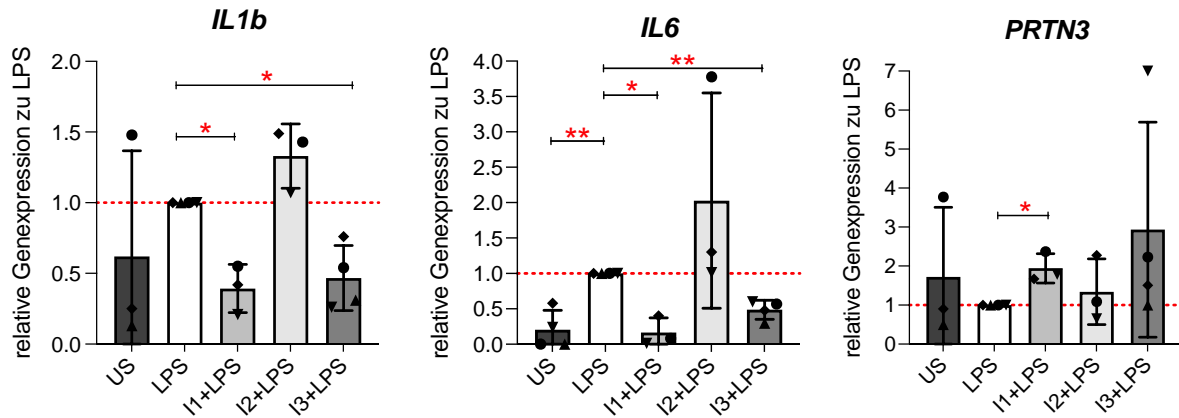


Abbildung 12: Effekte von LPS allein und in Kombination mit den IRAK-4 Inhibitoren 1 bis 3 auf die Expression proinflammatorischer Gene in neutrophilen Granulozyten
 Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. N=3 (I1 + I2) N=4 (I3). Abk: US: Unstimuliert, LPS: Lipopolysaccharide

4.3 IRAK-4 Inhibition in primären dermalen Fibroblasten

Als wesentlicher Bestandteil der dermalen Strukturen sind Fibroblasten hinsichtlich ihrer Einflussnahme auf entzündliche Prozesse von großem Interesse, weshalb die Wirkung der IRAK-4 Inhibitoren auf diesen Zelltyp ebenfalls evaluiert wurde.

4.3.1 IL-1 β induziert Genexpression verschiedener Zytokine in Fibroblasten

Bevor der Einfluss von IRAK-4 Inhibitoren an Fibroblasten getestet wurde, erfolgte analog zum Versuchsaufbau bei den Keratinozyten zunächst die Stimulation und anschließende Messung der Genexpressionslevel bekannter proinflammatorischer Zielgene. Als Stimulus wurde 50 ng/ml IL-1 β eingesetzt. Wie Abbildung 13 zu entnehmen ist, sind die relativen Genexpressionen der einzelnen Zytokine im Vergleich zur unstimulierten Probe alle signifikant gestiegen, wenn auch unterschiedlich stark. Während die Aktivitätslevel von *IL6*, *CXCL5* und *CXCL8* um das 1.000- bis 10.000-fache gestiegen sind, bewegten sich *TNF*, *IL19* und *TSLP* im Bereich zwischen 10- und 100-facher Aktivität.

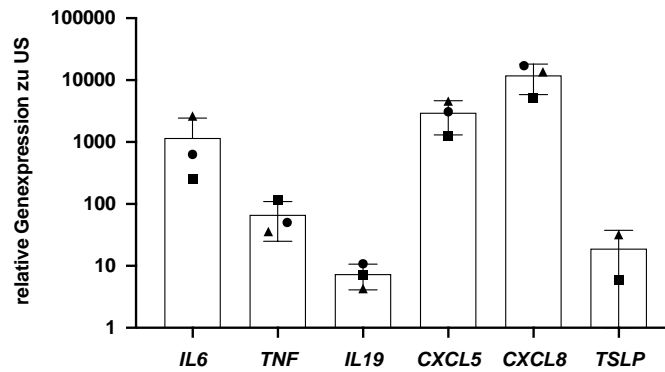


Abbildung 13: Induktion der Genexpression verschiedener Zytokine in dermalen Fibroblasten durch IL-1 β . Die Fibroblasten wurden \ddot{u} .N. mit 50 ng/ml IL-1 β stimuliert. Mittels qPCR erfolgte die Analyse relevanter Marker-gene. (N=3). Abk: US: Unstimuliert

4.3.2 IRAK-4 Inhibition hat keinen Einfluss auf Expression proinflammatorischer Gene in Fibroblasten

Die Behandlung der Fibroblasten mit den IRAK-4 Inhibitoren zeigte nach Stimulation mit IL-1 β keine eindeutigen Effekte für die Gene *IL-6*, *TNF*, *IL-19*, *CXCL5*, *CXCL8* und *TSLP*. Die Ergebnisse der PCR-Analysen sind in Abb. 14 dargestellt. Alle drei Inhibitoren führten unabhängig von ihrer Konzentration zu keiner signifikanten Veränderung der Genexpression in Fibroblasten.

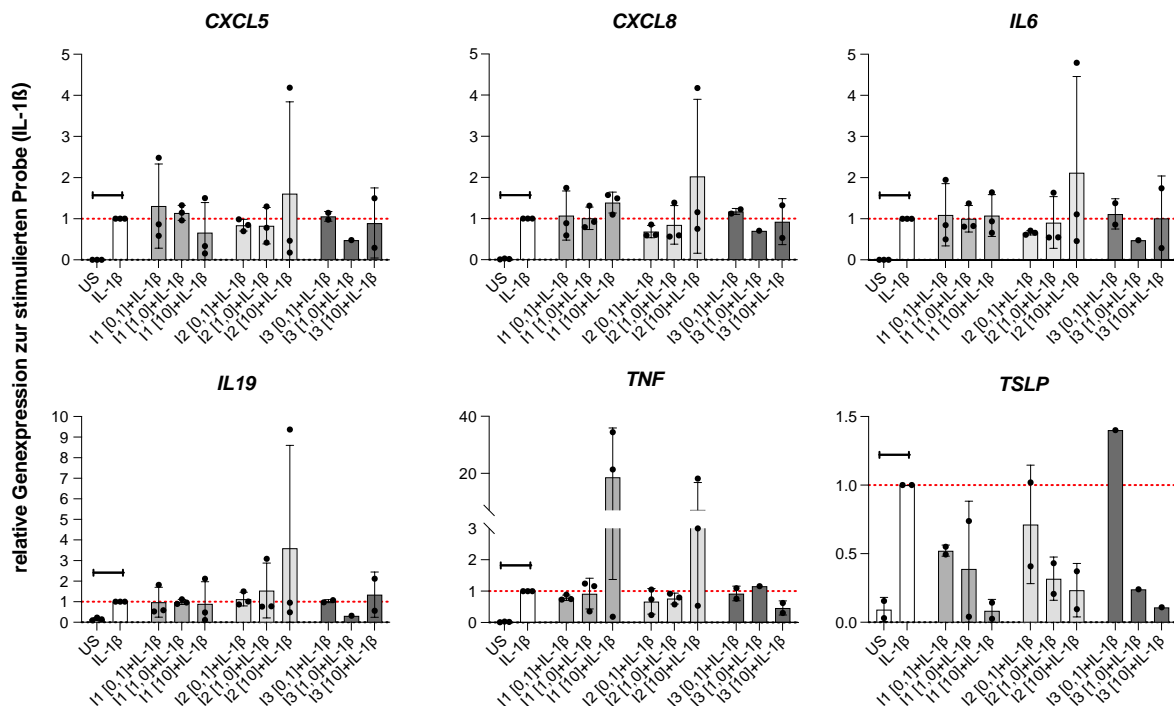


Abbildung 14: IRAK-4 Inhibition in dermalen Fibroblasten führt nicht zur Hemmung der IL-1 β -assoziierten Geninduktion.

Die Zellen wurden für eine Stunde mit den entsprechenden Konzentrationen an IRAK-4-Inhibitoren (0,1 μ M, 1,0 μ M, 10 μ M) in 2 ml DMEM inkubiert und im Anschluss \ddot{u} .N. mit 50 ng/ml IL-1 β stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels qPCR. (N=3). Abk: US: Unstimuliert

4.4 IRAK-4 Inhibition in primären peripheren T-Zellen

T-Zellen kommt im Rahmen der erworbenen Immunabwehr eine entscheidende Rolle in der Pathogenese entzündlicher Hauterkrankungen zu. Hier sind besonders die T_H2-Zellen (AE) und T_H17-Zellen (Psoriasis) zu erwähnen. Daher wurde der Einfluss einer IRAK-4 Inhibition auf ihre Aktivierung untersucht.

4.4.1 IRAK-4 Inhibitoren reduzieren Zytokinausschüttung von T-Lymphozyten

Aus humanen PBMCs isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden mit 0,75 µg/ml aCD3/aCD28 und 50 ng/ml IL-1β sowie den jeweiligen IRAK-4 Inhibitoren in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Nach drei Tagen wurde der produzierte Überstand im ELISA auf das Vorhandensein spezifischer für AE und Psoriasis pathogenetisch relevanter Zytokine analysiert.

Inhibitor 1 zeigte die stärksten Effekte mit einer signifikanten Verringerung der Ausschüttung von IFN-γ, IL-4, IL-17A, IL-22 und TNF-α um 70 bis 90 % (s. Abb. 15). Inhibitor 3 führte in etwas geringerem Ausmaß ebenfalls zu einer reduzierten Produktion aller gemessenen Zytokine (60-80 %). Inhibitor 2 dagegen wies lediglich für IL-22 einen signifikant hemmenden Einfluss auf.

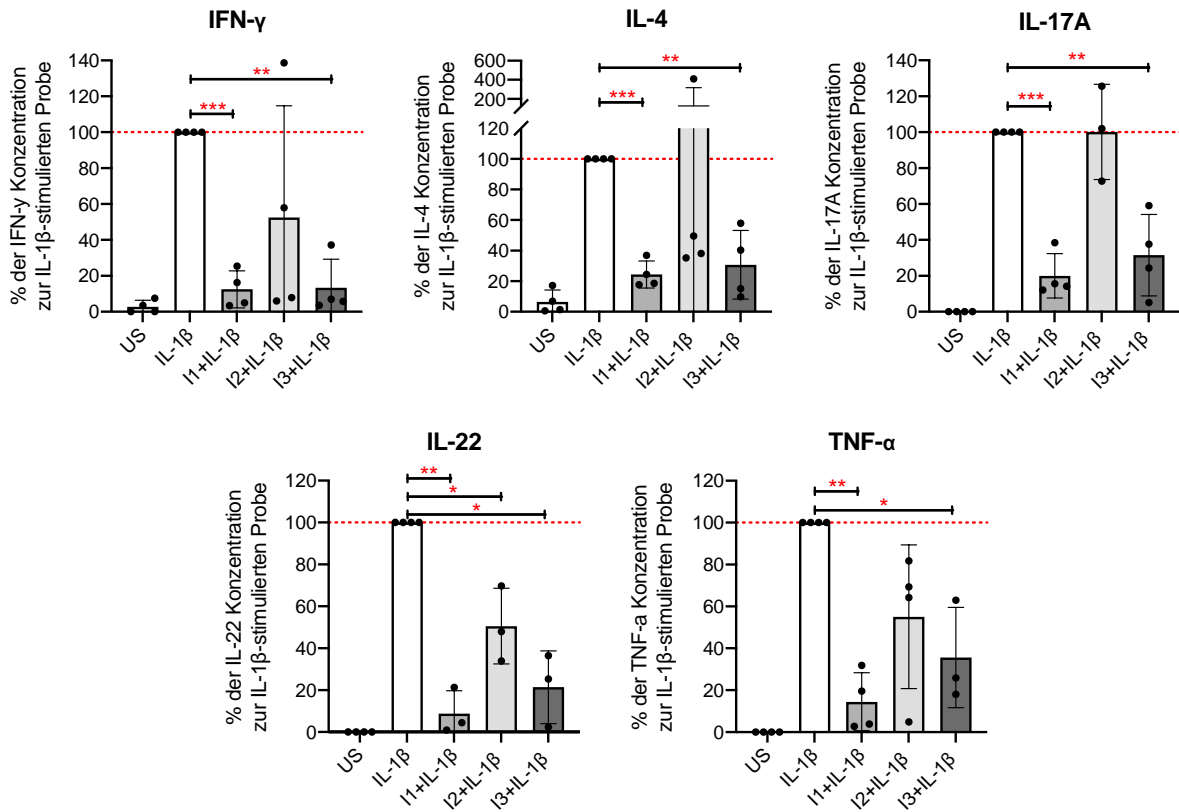


Abbildung 15: IRAK-4 Inhibition verringert signifikant die Zytokinausschüttung in T-Zellen als Reaktion auf die Co-Stimulation mit IL-1 β .

Die Proteinmenge der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-17A und IL-22 im T-Zellüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Signifikanzniveaus: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. N=4. Abk: US: Unstimuliert

4.4.2 Dosisabhängige Toxizität von IRAK-4 Inhibitoren auf T-Lymphozyten

Zur Objektivierung der Ergebnisse aus 4.4.1 wurde mittels einer DAPI-Färbung und anschließenden FACS-Analyse die dosisabhängige Toxizität von IRAK-4 Inhibitoren auf CD4⁺ T-Lymphozyten ermittelt. Eine hohe Toxizität würde ebenfalls zu einer Reduktion der Zytokinproduktion von T-Lymphozyten führen. Dies hätte fälschlicherweise die Annahme einer guten Wirksamkeit der Inhibitoren zur Folge.

Die IRAK-4 Inhibitoren wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen [10 μ M; 1,0 μ M; 0,1 μ M] getestet. Wie Abb. 16 zeigt, lässt sich der Zelltod durch die IRAK-4 Inhibitoren zwar induzieren, jedoch liegt der prozentuale Anteil toter T-Zellen selbst bei der höchsten Konzentration von 10 μ M lediglich bei 7 bis 10 %. Die Konzentrationen 1,0 μ M und 0,1 μ M liegen im Bereich der mit IL-1 β stimulierten Proben und zeigen daher keinen toxischen Effekt auf die T-Lymphozyten.

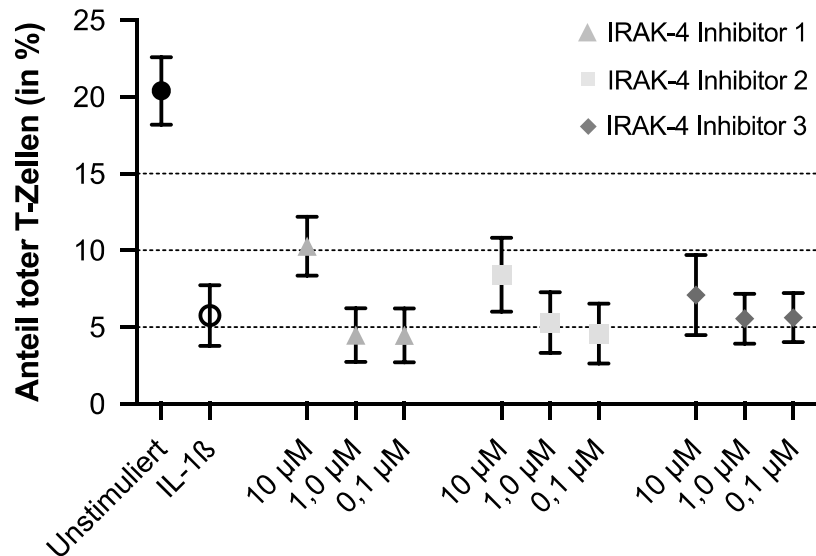


Abbildung 16: Dosisabhängige Toxizität von IRAK-4 Inhibitoren auf CD4+ T-Lymphozyten.

Gezeigt ist der prozentuale Anteil totter T-Lymphozyten an der Gesamtpopulation in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen der IRAK-4 Inhibitoren. N=3

4.5 IRAK-4 Inhibition beeinflusst Genexpression in läsionalen Hautbiopsien

Als größte Annäherung an das pathophysiologische Krankheitsmodell, sowohl was Zellkomplexität als auch proinflammatorische Stimuli angeht, wurden die IRAK-4 Inhibitoren an Biopsien läsionaler Haut von Patienten mit atopischem Ekzem und Psoriasis getestet. Die *ex-vivo* Inkubation der Vollhautbiopsien mit den IRAK-4 Inhibitoren erfolgte in einer Konzentration von 100 μM für 4 h und wurde von Manja Jargosch durchgeführt. Anschließend wurden mittels PCR die Aktivitätslevel pathogenetisch relevanter Zielgene im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe analysiert.

4.5.1 IRAK-4 Inhibition in AE-Biopsien verringert Expression der basophil-chemotaktischen Chemokine *MCP1* und *CXCL8* sowie der krankheitsspezifischen Zytokine *IL22* und *TNF*

Abbildung 17 zeigt die z.T. signifikant regulierten Genexpressionswerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

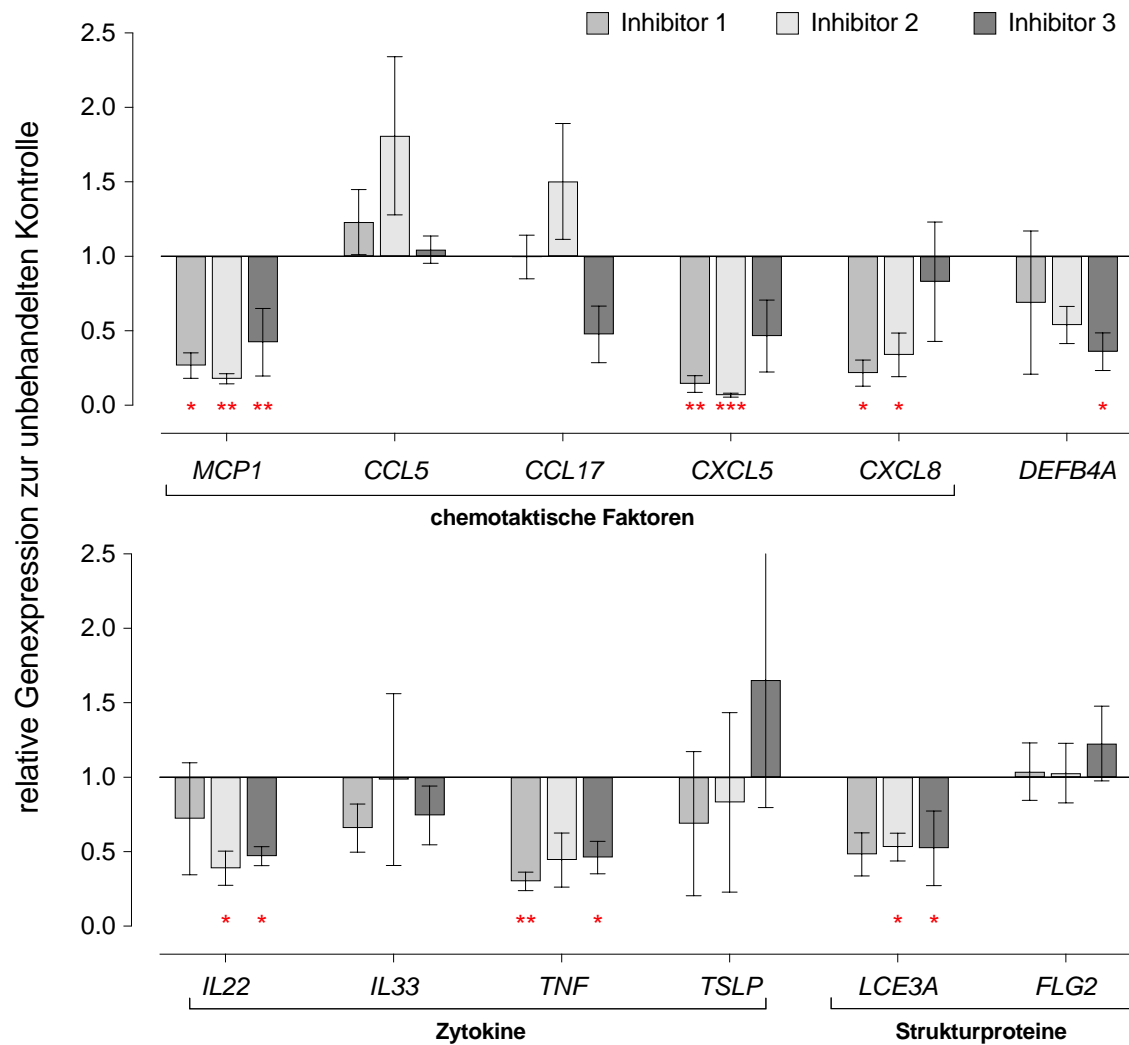


Abbildung 17: IRAK-4 Inhibition in läSIONalen AE-Biopsien unterdrückt die Expression pathogenetisch relevanter Zielgene.

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $N=3$

IRAK-4 Inhibitor 1 führte zu einer signifikanten Abnahme der Genexpression der für Chemokine codierenden Gene *CXCL5*, *CXCL8* und *MCP1* um 70 bis 85 % sowie des Zytokines *TNF* um 70 %. Zusätzlich konnten moderate, nicht signifikante Abnahmen der Expressionen von *IL33* und *LCE3A* beobachtet werden. Bei Behandlung mit IRAK-4 Inhibitor 2 konnten signifikante Verringerungen der Expressionswerte zwischen 40 und 90 % für die Gene *CXCL5*, *CXCL8*, *LCE3A*, *MCP1* und *IL22* verzeichnet werden. IRAK-4 Inhibitor 3 zeigte signifikante regulative Eigenschaften zwischen 40 und 60 % für die Gene *DEFB4A*, *LCE3A*, *IL22*, *TNF* und *MCP1*.

Auf die Genexpression von *CCL5*, *CCL17*, *FLG2* und *TSLP* konnte kein regulierender Effekt der getesteten IRAK-4 Inhibitoren nachgewiesen werden.

4.5.2 IRAK-4 Inhibition in Psoriasis-Biopsien verringert Expression der neutrophil-chemotaktischen Chemokine *CXCL8* und *CXCL5* sowie der krankheitsspezifischen Zytokine *IL23* und *TNF*

Die Inhibition von IRAK-4 in Biopsien von Psoriasispatienten scheint geringere Auswirkungen auf die Genexpression pathogenetisch relevanter Marker als beim atopischen Ekzem zu haben (s. Abb. 18).

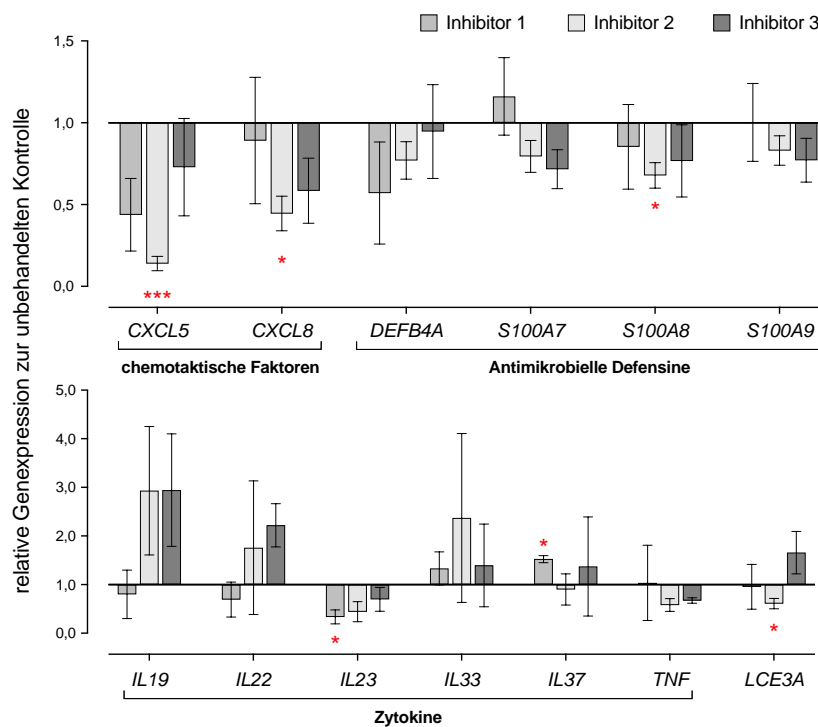


Abbildung 18: IRAK-4 Inhibition in läsionalen Psoriasis-Biopsien unterdrückt die Expression pathogenetisch relevanter Zielgene.

Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; N=4

IRAK-4 Inhibitor 1 führte zu einer signifikanten Hemmung der Expression von *IL23* (>60 %) sowie zu einem Anstieg des antiinflammatorisch wirksamen *IL37* (>50 %). Weitere Expressionsverringierungen waren, wenn auch statistisch nicht signifikant, für die Gene *DEFB4A*, *CXCL5*, *IL19* und *IL22* zu beobachten. Eine statistisch signifikante Verringerung der Expressionslevel konnte für IRAK-4 Inhibitor 2 bei den Genen *CXCL5* (>80 %), *CXCL8* (>50 %), *LCE3A* (40 %) und *S100A8* (>30 %) beobachtet werden, während *DEFB4A*, *IL23*, *S100A7*, *S100A9* und *TNF* moderat, aber nicht signifikant gehemmt wurden. IRAK-4 Inhibitor 3 verringerte die Expression von *CXCL5*, *CXCL8*, *IL23*, *TNF*, *S100A7*, *S100A8* und *S100A9* jeweils ohne Signifikanz.

4.6 Zusammenfassung der Effizienz der IRAK-4 Inhibitoren in humanen Zellen

Tabelle 19 fasst die Einflüsse der drei IRAK-4 Inhibitoren auf die getesteten Markergene für den jeweiligen Zelltypus zusammen.

Tabelle 19: Wirkungsprofile der getesteten IRAK-4 Inhibitoren in den unterschiedlichen Zelltypen und -verbänden.

Signifikanzniveaus: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. Plus (+) = regulierender Effekt ohne Signifikanz. ↓ Zytokinaktivität durch Inhibitor reduziert; ↑ Zytokinaktivität durch Inhibitor erhöht; - keine Effekte

		Gen/Protein	I1	I2	I3	AE	Pso	
Keratinozytenmonolayer	↓	CXCL5	*	*	**		X	
	↓	CXCL8	***	**	*	X	X	
	↓	IL19		***	**		X	
	↓	DEFB4A	*	*	*	X	X	
	↓	S100A7	**	*	**		X	
	↓	LCE3A	+	+		X	X	
3D-Keratinozyten-Modell	↑	CXCL5	+		+		X	
	↓	CXCL8	+		+	X	X	
	↓	IL19	*				X	
	↓	DEFB4A	**		****	X	X	
	↓	S100A7	+		**		X	
	↓	LCE3A	+		**	X	X	
	↓	IL23		**			X	
	↑	IL33	+	+	+	X		
Fibroblasten	-	CXCL5					X	
	-	CXCL8					X	
	-	IL6					X	
	-	IL19					X	
	-	TNF				X	X	
	-	TSLP				X		
Neutrophile Granulozyten	Migration	↓	+	**	*		X	
	Genexpression	↓	IL1b	*		*		X
		↓	IL6	*		**		
		↑	PRTN3	*				
	Proteinproduktion	↓	IL-1β	**		****		X
		↓	IL-6	**	*	*		
↓		MPO	***		*			

		Gen/Protein	I1	I2	I3	AE	Pso
CD4 ⁺ T-Lymphozyten	↓	IL-4	***		**	X	
	↓	IL-17A	***		**		X
	↓	IL-22	**	*	*	X	X
	↓	TNF-α	**	+	*	X	X
	↓	IFN-γ	***	+	**	X	X
AE-Biopsien	↓	CXCL5	**	***	+		X
	↓	CXCL8	*	*		X	X
	↓	DEFB4A		+	*	X	X
	↓	IL22		*	*	X	X
	↓	IL33	+		+	X	
	↓	LCE3A	+	*	*	X	X
	↓	MCP1	*	**	**	X	
	↓	TNF	**	+	*	X	X
	↓	CCL17			+	X	
Pso-Biopsien	↓	CXCL5	+	***			X
	↓	CXCL8		*	+	X	X
	↓	IL23	*	+	+		X
	↑	IL37	*				X
	↓	TNF		+	+	X	X
	↓	DEFB4A	+	+		X	X
	↓	LCE3A		*		X	X
	↑	IL22			+		X
	↓	S100A7		+	+		X
	↓	S100A8		*			X
↓	S100A9		+	+		X	

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde, soweit bekannt, erstmalig der Einfluss selektiver IRAK-4 Inhibitoren auf Genexpressionsmuster, Zytokinproduktion, chemotaktische Potentiale und Vitalität verschiedener humaner Zelltypen und -verbände untersucht, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung von chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen beteiligt sind. Ausgangspunkt der Versuche waren Laborexperimente des belgisch-niederländischen Pharmaunternehmens *Galapagos*, in denen am Mausmodell bereits *in-vivo* entzündungsmodulierende Eigenschaften der IRAK-4 Inhibitoren nachgewiesen wurden. Im Rahmen experimenteller Untersuchungen wurde jedoch berichtet, dass IRAK-4, abhängig von Spezies und Signalweg, unterschiedliche katalytische Aktivität aufweist (Chiang et al. 2011; Cushing et al. 2014). Somit war zu klären, inwiefern sich die Ergebnisse auf menschliche Zellverbände übertragen lassen. Zu diesem Zweck wurden zwei IRAK-4 Inhibitoren (I1, I3) von Galapagos sowie ein weiterer IRAK-4 Inhibitor der Firma Pfizer (I2) getestet. Die Auswertung unserer Versuchsansätze lieferte für alle drei Inhibitoren signifikante Effekte auf pathogenetisch relevante Zielstrukturen von atopischem Ekzem und Psoriasis. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass IRAK-4 in Anbetracht seiner zentralen Rolle zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr an der Pathogenese von entzündlichen Hauterkrankungen beteiligt ist.

5.1 Etablierung von *small molecules* in der Behandlung von Psoriasis und atopischem Ekzem

Neben den extrazellulär wirksamen Biologika basiert die Weiterentwicklung der Therapie chronisch-entzündlicher Hauterkrankungen auf einer weiteren Substanzgruppe, den sog. *small molecules*, zu deren Klasse auch die in dieser Arbeit untersuchten IRAK-4 Inhibitoren gezählt werden. Diese intrazellulär wirksamen niedermolekularen Hemmstoffe interferieren vorwiegend mit Rezeptoren bzw. Bestandteilen der Signaltransduktion und wirken auf diese Weise der proinflammatorischen Immunantwort entgegen.

Stellvertretend für die Weiterentwicklung von *small molecules* in der Dermatologie stehen bisher Hemmstoffe der Januskinasen (JAK), die als selektive Tyrosinkinaseinhibitoren die Signalweiterleitung von Zytokinrezeptoren ins Zellinnere stoppen und bereits in der Behandlung maligner Systemerkrankungen Anwendung finden (Ghoreschi et al. 2009). Im Unterschied zum Wirkmechanismus der Biologika blockieren die oral einzunehmenden JAK-Inhibitoren nicht nur eine Zielstruktur, sondern indirekt eine ganze Reihe verschiedener Zytokinrezeptoren, wodurch sich ein wesentlich breiteres Wirkungspotential ergibt. Ein großer Vorteil von JAK-Inhibitoren bzw. *small molecules* allgemein ist ihr schneller Wirkungseintritt, der sich bei Biologika mit mehreren Wochen nach Injektion vergleichsweise spät einstellt.

JAK-Inhibitoren haben sich über die Phase der klinischen Studien hinaus mittlerweile als hoch effektive Wirkstoffe auf dem pharmazeutischen Markt etabliert und bereits Einzug in die Therapie von chronisch entzündlichen Hauterkrankungen gehalten. Baricitinib, ein JAK-Inhibitor, der seit 2017 zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird, findet mittlerweile auch bei topisch therapieresistenten Formen des atopischen Ekzems Anwendung, nachdem er in zwei randomisierten Phase-3-Studien zu deutlichen Verbesserungen des Hautbefundes gegenüber Placebo-behandelten Patienten führte (Simpson et al. 2020). Im Jahr 2021 hat mit Upadacitinib ein weiterer JAK-Inhibitor die Zulassung erhalten und darf künftig in der Therapie von mittelschweren bis schweren Formen des AE sowie Psoriasisarthritis eingesetzt werden (Kathmann 2021).

5.2 IRAK-4 als attraktives Target in der Behandlung von inflammatorischen und hämatologischen Erkrankungen

Erste Erkenntnisse zum potenziellen Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum einer medikamentösen IRAK-4 Hemmung lieferten Untersuchungen an Patienten mit erblich bedingt inaktiven Formen von IRAK-4. Dabei fiel auf, dass ihre an der Immunabwehr beteiligten Blutzellen als Reaktion auf TLR-Liganden, anders als bei gesunden Probanden, nicht mit vermehrter Zytokinbildung reagierten (Picard et al. 2003).

Angesichts dieser scheinbar essenziellen Rolle in Signalkaskaden von TLR und IL-1R war davon auszugehen, dass eine Hemmung von IRAK-4 die Aktivität verschiedener Zelltypen direkt beeinflusst und deren Zytokinproduktion reduziert. Mit Effekten sowohl auf das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem repräsentiert IRAK-4 somit

einen alternativen Angriffspunkt zu den aktuell verfügbaren therapeutischen Optionen bei atopischem Ekzem und der Psoriasis.

Außerhalb der Dermatologie besteht auch in anderen Fachbereichen Interesse an der Entwicklung von IRAK-4 Hemmstoffen. So konnten in Tiermodellen für einige Erkrankungen bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Mittlerweile befinden sich vier verschiedene IRAK-4 Inhibitoren der Firmen Bayer (BAY1834845, BAY1830839), Pfizer (PF-06650833) und Curis® (CA-4948) zur Therapie der rheumatoiden Arthritis in der klinischen Erprobung (Wiese et al. 2020). In Mausmodellen zu Typ-2 Diabetes konnte über Inhibition von IRAK-4 die Progression von diabetischer Nephropathie gestoppt werden (Kondo et al. 2020). Neben der antiinflammatorischen Wirksamkeit wurde darüber hinaus in der Behandlung von hämatologischen Erkrankungen wie Non-Hodgkin Lymphom und AML durch IRAK-4 Inhibition eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums verzeichnet (Gummadi et al. 2020).

5.3 Krankheitsrelevante Effekte der IRAK-4 Inhibitoren auf atopisches Ekzem und Psoriasis

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die These, dass IRAK-4 einen vielversprechenden Angriffspunkt zur Behandlung entzündlicher Hauterkrankungen darstellt. Alle drei untersuchten IRAK-4 Inhibitoren zeigten deutliche Effekte auf zentrale, pathogenetisch relevante Mediatoren von atopischem Ekzem und Psoriasis. Diese Beobachtung galt für alle untersuchten Zelltypen (Keratinocyten, neutrophile Granulozyten, T-Zellen) und -verbände (Hautbiopsien), mit Ausnahme der Fibroblasten. Wie bereits in einer Publikation von 2014 beschrieben wurde, scheint die durch IL-1 β in Fibroblasten ausgelöste Immunantwort unabhängig von der katalytischen Aktivität von IRAK-4 abzulaufen (Cushing et al. 2014).

5.3.1 Atopisches Ekzem

Bei Auswertung der Versuchsergebnisse ist in Hinblick auf pathogenetisch relevante Faktoren des AE besonders die signifikante Reduktion von Defensinen (*LCE3A*, *DEFB4A*), Chemokinen (*CXCL5*, *CXCL8*, *MCP1*) und AE-spezifischen Zytokinen

(*IL33*, *IL22*, *TNF*) in Ekzembiospien sowie im 2D/3D-Keratinocyten-Modell hervorzuheben, da diese einen direkten Einfluss der Inhibitoren (v.a. I3) auf Keratinocyten belegt. Dies hat insofern große Relevanz, als IRAK-4 Inhibitoren auf diese Weise einen pathogenetisch wichtigen Zelltypus der angeborenen Immunabwehr hemmt, der von anderen aktuell verfügbaren Medikamenten, wie Biologika und JAK-Inhibitoren, nicht direkt beeinflusst wird.

Das Chemokin MCP-1 trägt beim AE durch Ausbildung eines chemotaktischen Gradienten zur Einwanderung von Monozyten und basophilen Granulozyten in die Dermis bei und begünstigt dadurch die typischen perivaskulären Ekzeminfiltrate (Trautmann et al. 2003). Die suffiziente Reduktion von MCP-1, wie sie in den AE-Biospien durch alle drei Inhibitoren beobachtet wurde, würde demnach *in-vivo* die Rekrutierung weiterer proinflammatorischer Zelltypen zum Ekzemherd vermindern und der Entzündung entgegenwirken.

Interleukin 33 gehört einer Gruppe von Zytokinen an, die die Ausreifung von naiven T-Zellen in Richtung eines T_H2-Phänotyps begünstigen und so vor allem die Ausbildung akuter Ekzempläsionen fördern. (Homey B. 2018). Darüber hinaus sind erhöhte Spiegel von IL-33 mit einer verminderten Expression des Strukturproteins Filaggrin (*FLG2*) in Keratinocyten assoziiert und schädigen so zusätzlich die Hautbarriere (Seltmann et al. 2015). Die in AE-Biospien beobachtete Expressionshemmung hätte demzufolge *in-vivo* positiven Einfluss auf zwei wesentliche pathogenetische Faktoren des AE.

IRAK-4 Inhibitor 1 hemmt, wenn auch aufgrund hoher Standardabweichungen nicht signifikant, die Expression von TSLP in AE-Biospien. Dieser endogene Mediator löst in läsionaler Haut über verschiedene Mechanismen Juckreiz aus und stellt damit einen wichtigen Faktor zur Einschränkung der Lebensqualität dar (Mollanazar et al. 2016). Studien untersuchen TSLP bereits als medikamentösen Angriffspunkt (NCT02525094).

Einen weiteren durch IRAK-4 Inhibition direkt beeinflussten Zelltypus stellt die CD4-positive T-Helferzelle dar. Die Inhibitoren 1 und 3 reduzierten die Produktion von IL-4, IL-22 und TNF- α . Die verminderte Präsenz des Schlüsselzytokins IL-4 in Ekzemherden könnte ähnlich wie die Reduktion von IL-33 einer Expressionsminderung von Filaggrin (*FLG2*) entgegenwirken und somit die fortschreitende Schädigung der Hautbarriere unterbrechen (Wollenberg et al. 2011). Die Hemmung der Zytokinproduktion von T-

Helferzellen nimmt indirekt auch Einfluss auf Keratinozyten, da deren Produktion antimikrobieller Peptide durch IL-4 gehemmt wird. So wäre über die wirksame IL-4 Reduktion *in-vivo* eine geringere Anfälligkeit für Infektionen mit Bakterien und Viren zu erwarten, die charakteristisch für das AE ist (Eyerich et al. 2009).

Darüber hinaus interessant ist die signifikante Hemmung von IL-22, einem von T_H22-Zellen ausgeschütteten Zytokin, das im chronischen Ekzem mit Akanthose und Lichenifikation assoziiert ist (Eyerich und Novak 2013). Daraus ergibt sich für die Inhibitoren theoretisch eine Wirksamkeit sowohl im akuten als auch chronischen Stadium der Erkrankung.

Die beobachtete Wirksamkeit der Inhibitoren wird durch die von *Galapagos* erzielten *in-vivo* Ergebnisse im Mausmodell unterstrichen. Eine mit MC903 (Calcipotriol) bzw. IL-33 ausgelöste Ekzemreaktion konnte mit dem IRAK-4 Inhibitor 1 wirksam eingedämmt werden. Die entzündungsbedingte kutane Schwellung ging signifikant zurück und bei histologischer Auswertung war ein deutlicher Rückgang der Eosinophilen- und T-Zellinfiltration zu verzeichnen. Zudem wurde in der Haut eine signifikante Expressionsminderung der AE-Zytokine *IL4*, *IL5*, *IL6* und *IL13* auf Genebene beobachtet (unpublizierte Daten).

5.3.2 Psoriasis

Für die Psoriasis konnte demonstriert werden, dass eine IRAK-4 Inhibition die Produktion von IL-17A, IL-22 und TNF- α in CD4-positiven T-Helferzellen wirksam vermindert und damit Einfluss auf pathogenetisch zentrale Zytokine nimmt. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass defiziente T_H17-Zellen mit katalytisch inaktiven Formen von IRAK-4 eine verminderte Expression des IL-23 Rezeptors und daran geknüpft eine ausbleibende Immunantwort auf IL-23 aufweisen (Staschke et al. 2009).

Neben dieser direkten Produktionshemmung von IL-17A in T-Zellen bestehen weitere indirekte Mechanismen, über den IRAK-4 Inhibitoren eine Reduktion der IL-17A Spiegel induzieren. Hierzu zählt die verminderte chemotaktische Rekrutierung neutrophiler Granulozyten - einem weiteren Produzenten von IL-17A - durch Produktionshemmung der Chemokine *CXCL5* und *CXCL8* in Keratinozyten. Die verminderte Präsenz von IL-17A in psoriatischer Haut hemmt auf diesem Wege zusätzlich die Produktion des

proinflammatorischen S100A7 (Psoriasin) in Keratinozyten und wirkt der Entzündungsreaktion entgegen (Hegyí et al. 2012). Zudem konnte die Produktion von IL-22 in T-Zellen gehemmt werden, wodurch *in-vivo* die Ausbildung der für die Psoriasis typischen Akanthose effizient zu verhindern wäre (Boniface et al. 2005).

In Keratinozyten führte die IRAK-4 Inhibition zu einer Produktionshemmung der Chemokine *CXCL5* und *CXCL8*, woraus eine verminderte chemotaktische Rekrutierung neutrophiler Granulozyten resultiert. Neben dem Migrationsverhalten konnte auch das Aktivitätslevel neutrophiler Granulozyten direkt inhibiert werden. So wurden Expression und Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 sowie MPO gehemmt.

Keratinozyten, die als Vertreter der angeborenen Immunität in psoriatischen Plaques massiv hyperproliferiert sind, produzieren charakteristischerweise vermehrt antimikrobielle Peptide, wie β -Defensin 2 (*DEFB4A*) oder S100-Proteine (Batycka-Baran et al. 2014). In Keratinozytenmonolayern, dem 3D-Keratinozyten-Modell sowie in Hautbiopsien konnte die Expression von *DEFB4A* und *S100A7* signifikant gehemmt werden, in den Biopsien zusätzlich noch die der Calgranuline *S100A8* und *S100A9*. Da β -Defensin 2 über Aktivierung von TLR-9 dendritische Zellen stimulieren kann, die ihrerseits pathogenetisch wichtige T-Zellen aktivieren, stellt seine Hemmung einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt dar (Lowes et al. 2014; Tewary et al. 2013). Für die überexprimierten S100-Proteine A8 und A9 konnte in einem Psoriasis-Mausmodell belegt werden, dass sie eine T-Zell abhängige Autoimmunantwort induzieren, sodass ihre Hemmung durch IRAK-4 Inhibitoren den Krankheitsverlauf an dieser Stelle beeinflussen könnte (Loser et al. 2010).

Auch die Expression von *IL23*, einem der wichtigsten Botenstoffe in der Immunpathogenese der Erkrankung mit maßgeblicher Beteiligung an terminaler Differenzierung und Erhaltung von T_H17-Zellen, wurde sowohl im 3D-Keratinozyten-Modell als auch in Biopsien durch IRAK-4 Inhibition signifikant gehemmt (McGeachy et al. 2009). Dieser Effekt ist im 3D-Modell vor allem auf eine direkte Beeinflussung der Keratinozyten zurückzuführen. In den Biopsien kommt die Modulation der dendritischen Zellen hinzu, denen als Hauptproduzenten von IL-23 eine entscheidende regulatorische Funktion in der Krankheitsentstehung zukommt (Wang und Bai 2020).

Die Expression des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-37 wurde durch IRAK-4 Inhibitor 1 in Biopsien von Psoriasispatienten signifikant erhöht. Eine Vermehrung dieses antientzündlichen Zytokins könnte ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion des Entzündungsgeschehens beitragen (Teng et al. 2014).

Dieser Zusammenhang wird durch das *in-vivo* Mausmodell von *Galapagos* zur Psoriasis unterstrichen. So zeigte sich die entzündungsbedingte Schwellung des Ohres als Reaktion auf Injektion von IL-23 bzw. durch Behandlung mit Imiquimod (IMQ) nach Zugabe der Inhibitoren rückläufig. Auf histologischer Ebene konnten sowohl Akantose als auch die ödematöse Schwellung der Dermis verhindert werden. Auf Genebene wurden u.a. die Expression der Pso-Marker *IL17A*, *IL22*, *S100A8* und *S100A9* signifikant in der Haut reduziert (unpublizierte Daten).

5.4 Mögliches Nebenwirkungsprofil

Die getesteten IRAK-4 Inhibitoren haben die Expressionsmuster vieler pathogenetisch relevanter Markergene und -proteine beeinflusst. Für einige krankheitsrelevante Zytokine konnten jedoch keine Effekte beobachtet werden, sodass von einer Spezifität der Inhibitoren ausgegangen werden kann. Ihr potenzielles Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum läge damit zwischen den sehr spezifisch wirkenden und meist nur ein Zytokin hemmenden Biologika und den breit antiinflammatorisch wirkenden Medikamenten, wie z.B. Azathioprin oder Glukokortikoiden. Da IRAK-4 Inhibitoren indirekt mehrere Zytokine parallel hemmen, sind potenziell ähnliche Nebenwirkungen wie bei JAK-Inhibitoren zu erwarten.

Studien zu IRAK-4 defizienten Patienten zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Systeminfektionen mit Pneumokokken, Staphylokokken und Pseudomonaden ohne Anhaltspunkte für vermehrte Infektionen mit Viren, Parasiten und Pilzen. Bei Kindern bis zu einem Alter von acht Jahren wurden tödliche Pneumokokkeninfektionen beschrieben, bei erwachsenen Patienten hingegen konnten insgesamt weniger und harmlosere Infektionen ohne Todesfolge beobachtet werden, was am Ehesten auf die Ausreifung von humoraler Immunität und immunologischem Gedächtnis im Laufe der Entwicklung zurückzuführen ist (Picard et al. 2010).

Eine klinische Phase-II-Studie zur Wirksamkeit von IRAK-4 Inhibitoren bei rheumatoider Arthritis registrierte nach 12-wöchiger oraler Gabe bei ca. 20 % der Behandelten als Hauptnebenwirkung bakterielle Infektionen bzw. Parasitenbefall; über die Schwere

wurden jedoch keine Angaben gemacht (Wiese et al. 2020). In einer Studie zu JAK-Inhibitoren wird das vermehrte Auftreten von Virusinfektionen unter Therapie (Winthrop 2017) berichtet, das wahrscheinlich im Zusammenhang mit der für JAK-Inhibitoren charakteristischen Hemmung des Interferonsystems zu sehen ist - hieraus ergibt sich ein wesentlicher Unterschied zum Nebenwirkungsspektrum der IRAK-4 Inhibitoren (Raftery und Stevenson 2017).

5.5 Ausblick

Aus den vorliegenden Ergebnissen ergibt sich die Hoffnung, IRAK-4 Inhibitoren zukünftig *in-vivo* substituieren und zu einer effektiven Therapieoption bei atopischem Ekzem und Psoriasis weiterentwickeln zu können. Die erhobenen Daten legen nahe, dass die Wirksamkeit der IRAK-4 Inhibitoren auf direkte Beeinflussung zentraler Mediatoren von Psoriasis (TNF- α , IL-23, IL-17A) und AE (IL-4, IL-13, IL-33) zurückzuführen ist und unterstützen damit die weitere Erforschung dieser Klasse von Kinaseinhibitoren.

Von großem Interesse wäre zusätzlich eine histologische Analyse der Proteinexpression von den aktiven phosphorylierten IRAK-4-Molekülen in verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen. So ergäben sich möglicherweise auch weitere Anwendungsgebiete der Inhibitoren. Aufgrund des Fehlens eines geeigneten p-IRAK-4 Antikörpers war dies bisher leider nicht möglich.

Sollte sich in klinischen Folgestudien Sicherheit und Wirksamkeit der IRAK-4 Inhibitoren bestätigen, wäre in einem nächsten Schritt die Frage der Applikationsform zu stellen. Die systemische Verträglichkeit eines oralen IRAK-4 Inhibitors der Firma *Bayer* wird in einer aktuellen Studie zur Therapie von rheumatoider Arthritis und anderen Autoimmunerkrankungen an gesunden Probanden und Psoriasispatienten durchgeführt (NCT03493269). Laut Studiendesign endet die klinische Beobachtung Anfang 2021, sodass mit baldigen Ergebnissen zu rechnen ist. Sollte sich dabei herausstellen, dass die orale Einnahme mit dem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen assoziiert ist, die eine Langzeitanwendung ausschließen, wäre künftig der Einsatz in kurzfristigen Intervalltherapien denkbar. Alternativ käme die klassischerweise mit weniger Nebenwirkungen assoziierte topische Applikation in Frage, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Medikamenten, wie beispielsweise Biologika.

6 Zusammenfassung

Mittlerweile herrscht Konsens darüber, dass die angeborene Immunabwehr eine wesentliche Rolle in der Entwicklung chronischer Entzündungsprozesse spielt. Daraus wird abgeleitet, dass Modulatoren dieser frühen Form der Immunantwort ein großes therapeutisches Potenzial bei immunvermittelten Erkrankungen besitzen.

Die Proteinkinase IRAK-4 ist an der Weiterleitung von proinflammatorischen Signalen der *Toll Like* (TL)-, Interleukin 1 (IL-1)- und Interleukin 18 (IL-18)-Rezeptoren beteiligt und stellt somit als Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort einen geeigneten therapeutischen Ansatzpunkt dar. Verschiedene experimentelle Untersuchungen haben bereits eine essenzielle Rolle von IRAK-4 in Immunantworten auf entzündliche Signalstoffe demonstriert. Diese Arbeit untersuchte erstmalig die antiinflammatorische Wirkung dreier IRAK-4 Inhibitoren im Kontext entzündlicher Hauterkrankungen. Der Fokus lag dabei auf den beiden chronisch verlaufenden Erkrankungen Psoriasis und atopisches Ekzem, an deren Entstehung eine Reihe proinflammatorischer Zytokine, wie IL-4, IL-17A, IL-22 und IL-23, mitwirken.

Um zelltypspezifische Unterschiede der IRAK-4 Inhibition zu identifizieren, wurden die Inhibierungsexperimente in verschiedenen primären humanen Zelltypen sowie in *in-vitro* und *ex-vivo* Hautmodellen untersucht. *In-vitro* kam es zu einer signifikanten Hemmung der TLR- und ILR-Antworten in Keratinozyten (Reduktion der Chemokine *CXCL5* und *CXCL8* sowie der Defensine *DEFB4A* und *S100A7*) neutrophilen Granulozyten (verringertes Migrationsverhalten, verringerte Produktion von IL-1 β und IL-6) und T-Zellen (verringerte Produktion von IL-4, IL-17A, IL22, TNF- α und IFN- γ), während dermale Fibroblasten kaum beeinflusst wurden. In menschlichen Hautbiopsien von Patienten mit atopischem Ekzem oder Psoriasis konnten die Inhibitoren die Expression pathogenetisch relevanter Markergene beeinflussen (Reduktion der Chemokine *MCP1*, *CXCL5* und *CXCL8*; sowie der Zytokine *IL22*, *IL23*, *IL33* und *TNF*). In nahezu allen durchgeführten Experimenten wirkte sich somit die IRAK-4 Hemmung auf zentrale Mediatoren der Psoriasis (TNF- α , IL-17A, IL-23, IL-22) und des atopischen Ekzems (IL-4, IL-22, IL-33) aus.

Zusammenfassend unterstreichen unsere Ergebnisse die zentrale Rolle von IRAK-4 in der Entstehung dermalen Inflammationsreaktionen sowie das Potenzial der getesteten Inhibitoren als Behandlungsoptionen bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen.

7 Literaturverzeichnis

- Alunno, A., Bartoloni, E., Bistoni, O., Nocentini, G., Ronchetti, S., Caterbi, S., Valentini, V., Riccardi, C. und Gerli, R. (2012). **Balance between regulatory T and Th17 cells in systemic lupus erythematosus: the old and the new.** *Clin Dev Immunol* 2012, 823085, doi: 10.1155/2012/823085.
- Ameyar, M., Wisniewska, M. und Weitzman, J. B. (2003). **A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against.** *Biochimie* 85, 747-752, doi: 10.1016/j.biochi.2003.09.006.
- Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. (1992). **Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine.** *FEBS Lett* 307, 97-101, doi: 10.1016/0014-5793(92)80909-z.
- Banchereau, J. und Steinman, R. M. (1998). **Dendritic cells and the control of immunity.** *Nature* 392, 245-252, doi: 10.1038/32588.
- Batycka-Baran, A., Maj, J., Wolf, R. und Szepietowski, J. C. (2014). **The new insight into the role of antimicrobial proteins-alarmins in the immunopathogenesis of psoriasis.** *J Immunol Res* 2014, 628289, doi: 10.1155/2014/628289.
- Bieber, T. (2010). **Atopic dermatitis.** *Ann Dermatol* 22, 125-137, doi: 10.5021/ad.2010.22.2.125.
- Boguniewicz, M. und Leung, D. Y. (2011). **Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation.** *Immunol Rev* 242, 233-246, doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01027.x.
- Boniface, K., Bernard, F.-X., Garcia, M., Gurney, A. L., Lecron, J.-C. und Morel, F. (2005). **IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes.** *The Journal of Immunology* 174, 3695-3702.
- Bos, J. D., de Rie, M. A., Teunissen, M. B. und Piskin, G. (2005). **Psoriasis: dysregulation of innate immunity.** *Br J Dermatol* 152, 1098-1107, doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06645.x.
- Brunner, P. M., Guttman-Yassky, E. und Leung, D. Y. (2017). **The immunology of atopic dermatitis and its reversibility with broad-spectrum and targeted therapies.** *J Allergy Clin Immunol* 139, S65-S76, doi: 10.1016/j.jaci.2017.01.011.
- Cerroni, L., Garbe, C., Metze, D., Kutzner, H. und Kerl, H. (2016). **Histopathologie der Haut**, 2. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, XIII, 975 S.

- Chandra, A., Ray, A., Senapati, S. und Chatterjee, R. (2015). **Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis**. *Mol Immunol* 64, 313-323, doi: 10.1016/j.molimm.2014.12.014.
- Chiang, E. Y., Yu, X. und Grogan, J. L. (2011). **Immune complex-mediated cell activation from systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients elaborate different requirements for IRAK1/4 kinase activity across human cell types**. *J Immunol* 186, 1279-1288, doi: 10.4049/jimmunol.1002821.
- Curotto de Lafaille, M. A. und Lafaille, J. J. (2002). **CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy**. *Curr Opin Immunol* 14, 771-778, doi: 10.1016/s0952-7915(02)00408-9.
- Cushing, L., Stochaj, W., Siegel, M., Czerwinski, R., Dower, K., Wright, Q., Hirschfield, M., Casanova, J. L., Picard, C., Puel, A., Lin, L. L. und Rao, V. R. (2014). **Interleukin 1/Toll-like receptor-induced autophosphorylation activates interleukin 1 receptor-associated kinase 4 and controls cytokine induction in a cell type-specific manner**. *J Biol Chem* 289, 10865-10875, doi: 10.1074/jbc.M113.544809.
- Cushing, L., Winkler, A., Jelinsky, S. A., Lee, K., Korver, W., Hawtin, R., Rao, V. R., Fleming, M. und Lin, L. L. (2017). **IRAK4 kinase activity controls Toll-like receptor-induced inflammation through the transcription factor IRF5 in primary human monocytes**. *J Biol Chem* 292, 18689-18698, doi: 10.1074/jbc.M117.796912.
- Czarnowicki, T., Krueger, J. G. und Guttman-Yassky, E. (2014). **Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: an evolving story with important clinical implications**. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2, 371-379; quiz 380-371, doi: 10.1016/j.jaip.2014.03.006.
- Danso, M. O., van Drongelen, V., Mulder, A., van Esch, J., Scott, H., van Smeden, J., El Ghalbzouri, A. und Bouwstra, J. A. (2014). **TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents**. *J Invest Dermatol* 134, 1941-1950, doi: 10.1038/jid.2014.83.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. und Chen, Z. J. (2000). **Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain**. *Cell* 103, 351-361, doi: 10.1016/s0092-8674(00)00126-4.
- Dharmage, S. C., Lowe, A. J., Matheson, M. C., Burgess, J. A., Allen, K. J. und Abramson, M. J. (2014). **Atopic dermatitis and the atopic march revisited**. *Allergy* 69, 17-27, doi: 10.1111/all.12268.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A. und Sallusto, F. (2009). **Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human**

- skin-homing memory T cells.** *Nat Immunol* 10, 857-863, doi: 10.1038/ni.1767.
- Eyerich, K. und Novak, N. (2013). **Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm.** *Allergy* 68, 974-982, doi: 10.1111/all.12184.
- Eyerich, K., Pennino, D., Scarponi, C., Foerster, S., Nasorri, F., Behrendt, H., Ring, J., Traidl-Hoffmann, C., Albanesi, C. und Cavani, A. (2009). **IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response.** *J Allergy Clin Immunol* 123, 59-66 e54, doi: 10.1016/j.jaci.2008.10.031.
- Fernandez, J. M., Fernandez, A. P. und Lang, D. M. (2017). **Biologic Therapy in the Treatment of Chronic Skin Disorders.** *Immunol Allergy Clin North Am* 37, 315-327, doi: 10.1016/j.iac.2017.01.006.
- Ferrao, R., Zhou, H., Shan, Y., Liu, Q., Li, Q., Shaw, D. E., Li, X. und Wu, H. (2014). **IRAK4 dimerization and trans-autophosphorylation are induced by Myddosome assembly.** *Mol Cell* 55, 891-903, doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.006.
- Foerster, S., Eyerich, K., Ring, J., Behrendt, H. und Traidl-Hoffmann, C. (2008). **Rolle von Keratinozyten in der Pathophysiologie des Ekzems.** *Allergo Journal* 17, 168-172, doi: 10.1007/BF03361775.
- Garlanda, C., Dinarello, C. A. und Mantovani, A. (2013). **The interleukin-1 family: back to the future.** *Immunity* 39, 1003-1018, doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010.
- Gay, N. J. und Gangloff, M. (2007). **Structure and function of Toll receptors and their ligands.** *Annu Rev Biochem* 76, 141-165, doi: 10.1146/annurev.biochem.76.060305.151318.
- Ghoreschi, K., Laurence, A. und O'Shea, J. J. (2009). **Janus kinases in immune cell signaling.** *Immunol Rev* 228, 273-287, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x.
- Gittler, J. K., Shemer, A., Suarez-Farinas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K. J., Wang, C. Q., Mitsui, H., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J. G. und Guttman-Yassky, E. (2012). **Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis.** *J Allergy Clin Immunol* 130, 1344-1354, doi: 10.1016/j.jaci.2012.07.012.
- Gladman, D. D., Poulin, Y., Adams, K., Bourcier, M., Barac, S., Barber, K., Chandran, V., Dutz, J., Flanagan, C., Gooderham, M. J., Gulliver, W. P., Ho, V. C., Hong, C. H., Karsh, J., Khraishi, M. M., Lynde, C. W., Papp, K. A., Rahman, P., Rohekar, S., Rosen, C. F., Russell, A. S., Vender, R. B., Yeung, J., Ziouzina, O. und Zummer, M. (2017). **Treating Psoriasis and Psoriatic Arthritis: Position Paper on Applying the Treat-to-target Concept to**

- Canadian Daily Practice.** J Rheumatol 44, 519-534, doi: 10.3899/jrheum.161473.
- Goldminz, A., Au, S., Kim, N., Gottlieb, A. und Lizzul, P. (2013). **NF- κ B: an essential transcription factor in psoriasis.** Journal of dermatological science 69, 89-94.
- Grindebacke, H., Wing, K., Andersson, A. C., Suri-Payer, E., Rak, S. und Rudin, A. (2004). **Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season.** Clin Exp Allergy 34, 1364-1372, doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.02067.x.
- Gummadi, V. R., Boruah, A., Ainan, B. R., Vare, B. R., Manda, S., Gondle, H. P., Kumar, S. N., Mukherjee, S., Gore, S. T., Krishnamurthy, N. R., Marappan, S., Nayak, S. S., Nellore, K., Balasubramanian, W. R., Bhumireddy, A., Giri, S., Gopinath, S., Samiulla, D. S., Dagainakatte, G., Basavaraju, A., Chelur, S., Eswarappa, R., Belliappa, C., Subramanya, H. S., Booher, R. N., Ramachandra, M. und Samajdar, S. (2020). **Discovery of CA-4948, an Orally Bioavailable IRAK4 Inhibitor for Treatment of Hematologic Malignancies.** ACS Med Chem Lett 11, 2374-2381, doi: 10.1021/acsmchemlett.0c00255.
- Harder, J. und Schroder, J. M. (2005). **Antimicrobial peptides in human skin.** Chem Immunol Allergy 86, 22-41, doi: 10.1159/000086650.
- Hawkes, J. E., Chan, T. C. und Krueger, J. G. (2017). **Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies.** J Allergy Clin Immunol 140, 645-653, doi: 10.1016/j.jaci.2017.07.004.
- Hawkes, J. E., Yan, B. Y., Chan, T. C. und Krueger, J. G. (2018). **Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis.** J Immunol 201, 1605-1613, doi: 10.4049/jimmunol.1800013.
- Hegy, Z., Zwicker, S., Bureik, D., Peric, M., Koglin, S., Batycka-Baran, A., Prinz, J. C., Ruzicka, T., Schaubert, J. und Wolf, R. (2012). **Vitamin D analog calcipotriol suppresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 "alarmins" psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in psoriasis.** J Invest Dermatol 132, 1416-1424, doi: 10.1038/jid.2011.486.
- Hirahara, K. und Nakayama, T. (2016). **CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm.** Int Immunol 28, 163-171, doi: 10.1093/intimm/dxw006.
- Homey B., R. T., Wollenberg A. (2018). **Atopisches Ekzem.** Plewig G., Ruzicka T., Kaufmann R., Hertl M. (eds) Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie., doi: https://doi.org/10.1007/978-3-662-49544-5_32.
- Ilkovitch, D. (2011). **Role of immune-regulatory cells in skin pathology.** J Leukoc Biol 89, 41-49, doi: 10.1189/jlb.0410229.

- J. Gordon Betts, K. A. Y., James A. Wise, Eddie Johnson, Brandon Poe, Dean H. Kruse, Oksana Korol, Jody E. Johnson, Mark Womble, Peter DeSaix (2013). **Anatomy and Physiology.**
- Kathmann, W. (2021). **PsA: 1-Jahres-Daten zu Upadacitinib vorgestellt.** Orthopädie & Rheuma 24, 61-61.
- Kawasaki, T. und Kawai, T. (2014). **Toll-like receptor signaling pathways.** Front Immunol 5, 461, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- Koecke, H. U., Emschermann, P. und Härle, E. (2000). **Biologie: Lehrbuch der allgemeinen Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler ; mit 22 Tabellen und 53 Exkursen,** Schattauer.
- Kondo, M., Tahara, A., Hayashi, K., Inami, H., Ishikawa, T. und Tomura, Y. (2020). **Therapeutic effects of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 inhibitor AS2444697 on diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 393, 1197-1209, doi: 10.1007/s00210-020-01816-2.
- Langan, S. M., Irvine, A. D. und Weidinger, S. (2020). **Atopic dermatitis.** Lancet 396, 345-360, doi: 10.1016/S0140-6736(20)31286-1.
- Li, S., Strelow, A., Fontana, E. J. und Wesche, H. (2002). **IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase.** Proc Natl Acad Sci U S A 99, 5567-5572, doi: 10.1073/pnas.082100399.
- Loser, K., Vogl, T., Voskort, M., Lueken, A., Kupas, V., Nacken, W., Klenner, L., Kuhn, A., Foell, D., Sorokin, L., Luger, T. A., Roth, J. und Beissert, S. (2010). **The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells.** Nat Med 16, 713-717, doi: 10.1038/nm.2150.
- Lowes, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., Bowman, E. P. und Krueger, J. G. (2008). **Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells.** J Invest Dermatol 128, 1207-1211, doi: 10.1038/sj.jid.5701213.
- Lowes, M. A., Suarez-Farinas, M. und Krueger, J. G. (2014). **Immunology of psoriasis.** Annu Rev Immunol 32, 227-255, doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120225.
- Lye, E., Mirtsos, C., Suzuki, N., Suzuki, S. und Yeh, W. C. (2004). **The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling.** J Biol Chem 279, 40653-40658, doi: 10.1074/jbc.M402666200.
- Lynch, M. D. und Watt, F. M. (2018). **Fibroblast heterogeneity: implications for human disease.** J Clin Invest 128, 26-35, doi: 10.1172/JCI93555.

- Martin, D. A., Towne, J. E., Kricorian, G., Klekotka, P., Gudjonsson, J. E., Krueger, J. G. und Russell, C. B. (2013). **The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings.** *J Invest Dermatol* 133, 17-26, doi: 10.1038/jid.2012.194.
- McGeachy, M. J., Chen, Y., Tato, C. M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W. M., McClanahan, T. K., O'Shea, J. J. und Cua, D. J. (2009). **The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo.** *Nat Immunol* 10, 314-324, doi: 10.1038/ni.1698.
- Moll, I., Jung, E. G. und Augustin, M. (2016). **Dermatologie**, 8. vollständig überarbeitete Auflage. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Mollanazar, N. K., Smith, P. K. und Yosipovitch, G. (2016). **Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out?** *Clin Rev Allergy Immunol* 51, 263-292, doi: 10.1007/s12016-015-8488-5.
- Monin, L. und Gaffen, S. L. (2018). **Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, doi: 10.1101/cshperspect.a028522.
- Mrowietz, U. und Reich, K. (2009). **Psoriasis--new insights into pathogenesis and treatment.** *Dtsch Arztebl Int* 106, 11-18, quiz 19, doi: 10.3238/arztebl.2009.0011.
- Muller, S., Schultes, D. und Wilsmann-Theis, D. (2020). **[Management of plaque psoriasis in adults].** *Hautarzt* 71, 227-243, doi: 10.1007/s00105-020-04555-w.
- Murphy, K. M., Travers, P., Walport, M., Janeway, C. und Ehrenstein, M. (2014). **Janeway - Immunologie**, 7. Aufl., korr. Nachdr. Aufl., Springer Spektrum, Berlin.
- Nalbandian, A., Crispin, J. C. und Tsokos, G. C. (2009). **Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts.** *Clin Exp Immunol* 157, 209-215, doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03944.x.
- Neumann, J. (2008). **Das Immunsystem.** In: *Immunbiologie: Eine Einführung*, Hrsg. Neumann, J., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 1-28.
- Nogralles, K. E., Zaba, L. C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., Bergman, R., Krueger, J. G. und Guttman-Yassky, E. (2009). **IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells.** *J Allergy Clin Immunol* 123, 1244-1252 e1242, doi: 10.1016/j.jaci.2009.03.041.
- Nutten, S. (2015). **Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors.** *Ann Nutr Metab* 66 Suppl 1, 8-16, doi: 10.1159/000370220.

- O'Garra, A., Gabrysova, L. und Spits, H. (2011). **Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells.** *Nat Immunol* 12, 288-294, doi: 10.1038/ni.2003.
- Oliveira Mde, F., Rocha Bde, O. und Duarte, G. V. (2015). **Psoriasis: classical and emerging comorbidities.** *An Bras Dermatol* 90, 9-20, doi: 10.1590/abd1806-4841.20153038.
- Ong, P. Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R. L. und Leung, D. Y. (2002). **Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis.** *N Engl J Med* 347, 1151-1160, doi: 10.1056/NEJMoa021481.
- Onishi, R. M. und Gaffen, S. L. (2010). **Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease.** *Immunology* 129, 311-321, doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03240.x.
- Peng, W. und Novak, N. (2015). **Pathogenesis of atopic dermatitis.** *Clin Exp Allergy* 45, 566-574, doi: 10.1111/cea.12495.
- Perera, G. K., Di Meglio, P. und Nestle, F. O. (2012). **Psoriasis.** *Annu Rev Pathol* 7, 385-422, doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132448.
- Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C. L., Bustamante, J., Yang, K., Soudais, C., Dupuis, S., Feinberg, J., Fieschi, C., Elbim, C., Hitchcock, R., Lammas, D., Davies, G., Al-Ghoniaim, A., Al-Rayes, H., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Al-Mohsen, I. Z., Frayha, H. H., Rucker, R., Hawn, T. R., Aderem, A., Tufenkeji, H., Haraguchi, S., Day, N. K., Good, R. A., Gougerot-Pocidallo, M. A., Ozinsky, A. und Casanova, J. L. (2003). **Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency.** *Science* 299, 2076-2079, doi: 10.1126/science.1081902.
- Picard, C., von Bernuth, H., Ghandil, P., Chrabieh, M., Levy, O., Arkwright, P. D., McDonald, D., Geha, R. S., Takada, H., Krause, J. C., Creech, C. B., Ku, C. L., Ehl, S., Marodi, L., Al-Muhsen, S., Al-Hajjar, S., Al-Ghoniaim, A., Day-Good, N. K., Holland, S. M., Gallin, J. I., Chapel, H., Speert, D. P., Rodriguez-Gallego, C., Colino, E., Garty, B. Z., Roifman, C., Hara, T., Yoshikawa, H., Nonoyama, S., Domachowske, J., Issekutz, A. C., Tang, M., Smart, J., Zitnik, S. E., Hoarau, C., Kumararatne, D. S., Thrasher, A. J., Davies, E. G., Bethune, C., Sirvent, N., de Ricaud, D., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Guedes, M., Vitor, A. B., Rodrigo, C., Almazan, F., Mendez, M., Arostegui, J. I., Alsina, L., Fortuny, C., Reichenbach, J., Verbsky, J. W., Bossuyt, X., Doffinger, R., Abel, L., Puel, A. und Casanova, J. L. (2010). **Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency.** *Medicine (Baltimore)* 89, 403-425, doi: 10.1097/MD.0b013e3181fd8ec3.
- Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R. und Hertl, M. (2018). **Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie**, 7th ed. 2018. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

- Rafferty, N. und Stevenson, N. J. (2017). **Advances in anti-viral immune defence: revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway.** *Cell Mol Life Sci* 74, 2525-2535, doi: 10.1007/s00018-017-2520-2.
- Robinson, D. S. (2009). **Regulatory T cells and asthma.** *Clin Exp Allergy* 39, 1314-1323, doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03301.x.
- Romagnani, S. (1996). **Th1 and Th2 in human diseases.** *Clin Immunol Immunopathol* 80, 225-235, doi: 10.1006/clin.1996.0118.
- Romagnani, S. (1999). **Th1/Th2 cells.** *Inflamm Bowel Dis* 5, 285-294, doi: 10.1097/00054725-199911000-00009.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. und Ono, M. (2008). **Regulatory T cells and immune tolerance.** *Cell* 133, 775-787, doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009.
- Sauder, D. N. (1990). **The role of epidermal cytokines in inflammatory skin diseases.** *J Invest Dermatol* 95, 27S-28S, doi: 10.1111/1523-1747.ep12505705.
- Schafer, I., Rustenbach, S. J., Radtke, M., Augustin, J., Glaeske, G. und Augustin, M. (2011). **[Epidemiology of psoriasis in Germany--analysis of secondary health insurance data].** *Gesundheitswesen* 73, 308-313, doi: 10.1055/s-0030-1252022.
- Schütt, C. und Bröker, B. (2009). **Grundwissen Immunologie**, 2nd ed. 2009. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Seltmann, J., Roesner, L. M., von Hesler, F. W., Wittmann, M. und Werfel, T. (2015). **IL-33 impacts on the skin barrier by downregulating the expression of filaggrin.** *J Allergy Clin Immunol* 135, 1659-1661 e1654, doi: 10.1016/j.jaci.2015.01.048.
- Simon, D. und Bieber, T. (2014). **Systemic therapy for atopic dermatitis.** *Allergy* 69, 46-55, doi: 10.1111/all.12339.
- Simpson, E. L., Bieber, T., Eckert, L., Wu, R., Ardeleanu, M., Graham, N. M., Pirozzi, G. und Mastey, V. (2016). **Patient burden of moderate to severe atopic dermatitis (AD): Insights from a phase 2b clinical trial of dupilumab in adults.** *J Am Acad Dermatol* 74, 491-498, doi: 10.1016/j.jaad.2015.10.043.
- Simpson, E. L., Lacour, J. P., Spelman, L., Galimberti, R., Eichenfield, L. F., Bissonnette, R., King, B. A., Thyssen, J. P., Silverberg, J. I., Bieber, T., Kabashima, K., Tsunemi, Y., Costanzo, A., Guttman-Yassky, E., Beck, L. A., Janes, J. M., DeLozier, A. M., Gamalo, M., Brinker, D. R., Cardillo, T., Nunes, F. P., Paller, A. S., Wollenberg, A. und Reich, K. (2020). **Baricitinib in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis and inadequate response to topical corticosteroids: results from two randomized monotherapy phase III trials.** *Br J Dermatol* 183, 242-255, doi: 10.1111/bjd.18898.

- Soussi-Gounni, A., Kontolemos, M. und Hamid, Q. (2001). **Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases.** *J Allergy Clin Immunol* 107, 575-582, doi: 10.1067/mai.2001.114238.
- Staschke, K. A., Dong, S., Saha, J., Zhao, J., Brooks, N. A., Hepburn, D. L., Xia, J., Gulen, M. F., Kang, Z., Altuntas, C. Z., Tuohy, V. K., Gilmour, R., Li, X. und Na, S. (2009). **IRAK4 kinase activity is required for Th17 differentiation and Th17-mediated disease.** *J Immunol* 183, 568-577, doi: 10.4049/jimmunol.0802361.
- Stölzl, D. und Weidinger, S. (2021). **Die Ära der Biologika für die Behandlung der atopischen Dermatitis hat begonnen.** *Allergologie* 44, 701.
- Suarez-Farinas, M., Tintle, S. J., Shemer, A., Chiricozzi, A., Nograles, K., Cardinale, I., Duan, S., Bowcock, A. M., Krueger, J. G. und Guttman-Yassky, E. (2011). **Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities.** *J Allergy Clin Immunol* 127, 954-964 e951-954, doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1124.
- Suzuki, N., Suzuki, S. und Yeh, W. C. (2002). **IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity.** *Trends Immunol* 23, 503-506, doi: 10.1016/s1471-4906(02)02298-6.
- Teng, X., Hu, Z., Wei, X., Wang, Z., Guan, T., Liu, N., Liu, X., Ye, N., Deng, G. und Luo, C. (2014). **IL-37 ameliorates the inflammatory process in psoriasis by suppressing proinflammatory cytokine production.** *The Journal of Immunology* 192, 1815-1823.
- Tewary, P., de la Rosa, G., Sharma, N., Rodriguez, L. G., Tarasov, S. G., Howard, O. M., Shirota, H., Steinhagen, F., Klinman, D. M., Yang, D. und Oppenheim, J. J. (2013). **beta-Defensin 2 and 3 promote the uptake of self or CpG DNA, enhance IFN-alpha production by human plasmacytoid dendritic cells, and promote inflammation.** *J Immunol* 191, 865-874, doi: 10.4049/jimmunol.1201648.
- Thaci, D., Simpson, E. L., Beck, L. A., Bieber, T., Blauvelt, A., Papp, K., Soong, W., Worm, M., Szepietowski, J. C., Sofen, H., Kawashima, M., Wu, R., Weinstein, S. P., Graham, N. M., Pirozzi, G., Teper, A., Sutherland, E. R., Mastey, V., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. und Ardeleanu, M. (2016). **Efficacy and safety of dupilumab in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical treatments: a randomised, placebo-controlled, dose-ranging phase 2b trial.** *Lancet* 387, 40-52, doi: 10.1016/S0140-6736(15)00388-8.
- Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H. und Baccala, R. (2017). **The multiple pathways to autoimmunity.** *Nat Immunol* 18, 716-724, doi: 10.1038/ni.3731.
- Trautmann, A., Disch, R., Brocker, E. B., Akdis, C. A. und Gillitzer, R. (2003). **[How does eczema arise?].** *J Dtsch Dermatol Ges* 1, 8-11, doi: 10.1046/j.1610-0387.2003.t01-1-02020.x.

- Turvey, S. E. und Speert, D. P. (2007). **Recurrent systemic pneumococcal disease and IRAK4 deficiency**. *Pediatr Infect Dis J* 26, 1074; author reply 1074, doi: 10.1097/INF.0b013e318156fb93.
- Wang, A. und Bai, Y. (2020). **Dendritic cells: The driver of psoriasis**. *J Dermatol* 47, 104-113, doi: 10.1111/1346-8138.15184.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. und Murphy, K. M. (2006). **Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties**. *Immunity* 24, 677-688, doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.002.
- Weigle, N. und McBane, S. (2013). **Psoriasis**. *Am Fam Physician* 87, 626-633.
- Wiese, M. D., Manning-Bennett, A. T. und Abuhelwa, A. Y. (2020). **Investigational IRAK-4 inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis**. *Expert Opin Investig Drugs* 29, 475-482, doi: 10.1080/13543784.2020.1752660.
- Winthrop, K. L. (2017). **The emerging safety profile of JAK inhibitors in rheumatic disease**. *Nat Rev Rheumatol* 13, 320, doi: 10.1038/nrrheum.2017.51.
- Wolk, K., Witte, E., Warszawska, K., Schulze-Tanzil, G., Witte, K., Philipp, S., Kunz, S., Docke, W. D., Asadullah, K., Volk, H. D., Sterry, W. und Sabat, R. (2009). **The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis**. *Eur J Immunol* 39, 3570-3581, doi: 10.1002/eji.200939687.
- Wollenberg, A., Rawer, H. C. und Schaubert, J. (2011). **Innate immunity in atopic dermatitis**. *Clin Rev Allergy Immunol* 41, 272-281, doi: 10.1007/s12016-010-8227-x.
- Worm, M., Francuzik, W., Kraft, M. und Alexiou, A. (2020). **Modern therapies in atopic dermatitis: biologics and small molecule drugs**. *J Dtsch Dermatol Ges* 18, 1085-1092, doi: 10.1111/ddg.14175.
- Zaba, L. C., Fuentes-Duculan, J., Eungdamrong, N. J., Abello, M. V., Novitskaya, I., Pierson, K. C., Gonzalez, J., Krueger, J. G. und Lowes, M. A. (2009). **Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells**. *J Invest Dermatol* 129, 79-88, doi: 10.1038/jid.2008.194.
- Zeichner, J. A. und Armstrong, A. (2016). **The Role of IL-17 in the Pathogenesis and Treatment of Psoriasis**. *J Clin Aesthet Dermatol* 9, S3-S6.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut.	9
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der CD4+ TH-Zell-Subpopulationen. ...	14
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Signalkaskade von TL- und IL-Rezeptoren.	22
Abbildung 4: Menschliches 3D-Hautmodell nach durchgeführtem Airlift.	32
Abbildung 5: Vergleich des histologischen Aufbaus von 3D-Keratinozyten-Modell und menschlicher Haut.	33
Abbildung 6: Relative Zusammensetzung des läsionalen T-Zell-Überstand-Mix von 5 Patienten mit atopischem Ekzem.	38
Abbildung 7: Bakteriellies Flagellin (FLG) induziert einen starken Expressionsanstieg proinflammatorischer Gene in Keratinozyten	47
Abbildung 8: Inhibition von IRAK-4 in humanen Keratinozyten reduziert Genexpression von Zytokinen, chemotaktischen Faktoren und antimikrobiellen Peptiden.	48
Abbildung 9: IRAK-4 Inhibitoren neutralisieren die Expression proinflammatorischer Gene im 3D-Modell nach Stimulation mit T-Zell-Überstand (TCS) von Patienten mit atopischem Ekzem.	50
Abbildung 10: IRAK-4 Inhibition in humanen Keratinozyten reduziert chemotaktische Rekrutierung neutrophiler Granulozyten.	52
Abbildung 11: IRAK-4 Inhibitoren hemmen Ausschüttung von Zytokinen und MPO in neutrophilen Granulozyten.	53
Abbildung 12: Effekte von LPS allein und in Kombination mit den IRAK-4 Inhibitoren 1 bis 3 auf die Expression proinflammatorischer Gene in neutrophilen Granulozyten	54
Abbildung 13: Induktion der Genexpression verschiedener Zytokine in dermalen Fibroblasten durch IL-1 β	55
Abbildung 14: IRAK-4 Inhibition in dermalen Fibroblasten führt nicht zur Hemmung der IL-1 β -assoziierten Geninduktion.	55
Abbildung 15: IRAK-4 Inhibition verringert signifikant die Zytokinausschüttung in T-Zellen als Reaktion auf die Co-Stimulation mit IL-1 β	57
Abbildung 16: Dosisabhängige Toxizität von IRAK-4 Inhibitoren auf CD4+ T-Lymphozyten.	58

Abbildung 17: IRAK-4 Inhibition in läsionalen AE-Biopsien unterdrückt die Expression pathogenetisch relevanter Zielgene.	59
Abbildung 18: IRAK-4 Inhibition in läsionalen Psoriasis-Biopsien unterdrückt die Expression pathogenetisch relevanter Zielgene.	60

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Angeborene Immunerkennung durch Toll-like-Rezeptoren.....	21
Tabelle 2: Geräte.....	24
Tabelle 3: Chemikalien.....	24
Tabelle 4: Reagenzien.....	25
Tabelle 5: Zytokine und Stimulanzen.....	25
Tabelle 6: Kits.....	25
Tabelle 7: Medien und Puffer.....	26
Tabelle 8: Medium-Supplemente.....	26
Tabelle 9: Verbrauchsmaterial.....	27
Tabelle 10: IRAK-4 Inhibitoren.....	27
Tabelle 11: Primer.....	27
Tabelle 12: Konzentrationen der eingesetzten IRAK-4 Inhibitoren.....	31
Tabelle 13: Reaktionsschritte der cDNA-Synthese.....	41
Tabelle 14: Reaktionsbestandteile der cDNA-Synthese.....	41
Tabelle 15: Arbeitskonzentrationen und eingesetzte Volumina der PCR-Substanzen	42
Tabelle 16: Protokoll real-time PCR.....	42
Tabelle 17: Verdünnungen der analysierten T-Zell-Überstände im ELISA in Abhängigkeit des zu messenden Zytokins.....	44
Tabelle 18: Zusammensetzung und Mengenangaben der TMB-Substratlösung zur Inkubation einer 96-Well-Platte.....	44
Tabelle 19: Wirkungsprofile der getesteten IRAK-4 Inhibitoren in den unterschiedlichen Zelltypen und -verbänden.....	61

10 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Tilo Biedermann, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München, für das Ermöglichen dieser Promotion an seinem Institut.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Kilian Eyerich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die fachlichen Korrekturen und wertvollen Anregungen während der Durchführung dieser Arbeit. Gleichzeitig danke ich Frau Prof. Dr. Stefanie Eyerich für die durchweg äußerst hilfreiche und konstruktive Betreuung.

In besonderem Maße dankbar bin ich Dr. Manja Jargosch für die hervorragende und zeitintensive Unterstützung. Ihre Hilfsbereitschaft, technische Anleitung und Einführung in die Laborphase, Anregungen und nicht zuletzt Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit, stellen wesentliche Faktoren zum Gelingen dieser Dissertation dar.

Weiterhin danke ich Jana Säger für ihre Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung laborchemischer Experimente. Dem gesamten Team des Zentrums für Allergie und Umwelt der Technischen Universität München gebührt mein Dank für die äußerst angenehme Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.