

Aus der Abteilung Immundermatologie  
und experimentelle Allergologie  
der Medizinischen Hochschule Hannover

Effekte von Ciclosporin A auf Th17-Zellen  
und humane Keratinozyten

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
in der  
Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von  
Katrin Schüür  
aus Bremen

Hannover 2017

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover  
am 25.06.2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Christopher Baum

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. med. Thomas Werfel

Referent: Prof. Dr. med. Torsten Witte

Korreferent: Prof. Dr. med. Jens Hohlfeld

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2018

Prüfungsausschussmitglieder: Prof. Dr. med. Alexander Kapp

PD Dr. med. Tilman Calließ

PD Dr. med. Oliver Bachmann

Für Oma & Opa Barrien

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Die Haut und ihre Funktion	1
1.1.1	Epidermis	1
1.1.1.1	Die Zellen der Epidermis – Keratinozyten	1
1.1.1.2	Aufbau der Epidermis – „cornified envelope“	2
1.2	Immunsystem der Haut	2
1.2.1	Angeborenes Immunsystem – antimikrobielles Peptid hBD-2	2
1.2.2	Das adaptive Immunsystem	3
1.2.2.1	Subgruppen von T-Helfer (Th)-Zellen	4
1.2.2.1.1	Th1/Th2	4
1.2.2.1.2	Th17	5
1.2.2.1.3	Th22	6
1.3	Atopische Dermatitis	7
1.3.1	Epidemiologie, Klinik	7
1.3.2	Pathogenese	7
1.4	Psoriasis	9
1.4.1	Epidemiologie, Klinik	9
1.4.2	Pathogenese	10
1.5	Calcineurin-Inhibitoren	11
1.5.1	Ciclosporin A	11
1.5.2	Tacrolimus	12
1.6	Therapiestufen bei atopischer Dermatitis und Psoriasis	14
1.6.1	Klinische Anwendung von Tacrolimus	14
1.6.2	Klinische Anwendung von Ciclosporin A	15
1.7	Fragestellung, Ziel der Arbeit	16
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1	Material	17
2.1.1	Medien, Puffer, Lösungen	17
2.1.2	Zytokine und Antikörper	19
2.1.3	Reagenzien und Kits	21
2.1.4	Geräte	24

2.1.5	Sonstiges Verbrauchsmaterial .....	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Buffy Coat: Isolation von PBMC .....	26
2.2.2	Zellzahlbestimmung .....	26
2.2.3	MACS <sup>®</sup> Isolation: T-Zellen CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> .....	27
2.2.4	Polarisierung Th17-Zellen .....	27
2.2.5	Primärzellkultur: Vorhautkeratinozyten.....	27
2.2.6	Keratinozyten Zellkultivierung: Zellkulturvorbereitung .....	28
2.2.7	Durchflusszytometrie.....	29
2.2.8	ELISA.....	31
2.2.9	RNA-Isolation und cDNA-Präparation .....	31
2.2.10	Statistik.....	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>34</b>
3.1	Untersuchung des Effekts von Ciclosporin A auf die Funktion von PBMC .....	34
3.1.1	Analyse von Haut-spezifischen T-Zellen .....	34
3.1.1.1	Wirkung von Ciclosporin A auf CLA <sup>+</sup> -T-Zellen.....	34
3.1.1.2	Wirkung von Ciclosporin A auf CCR6 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	36
3.1.2	Wirkung von Ciclosporin A auf die Expression von IL-17, IL-22 und IL-23R .....	37
3.2	Polarisierte T-Lymphozyten – Th17-Zellen .....	38
3.2.1	Reinheitskontrolle der verwendeten CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> -T- Lymphozyten.....	39
3.2.2	Einfluss von Ciclosporin A auf IL-17 und IL-22.....	39
3.3	Untersuchung des Effekts von Ciclosporin A auf die Funktion von Keratinozyten.....	42
3.3.1	Durchflusszytometrischer Nachweis der Aktivierung durch IFN-γ ....	42
3.3.2	Wirkung von Ciclosporin A auf die Expression von Membranmolekülen auf durch IFN-γ aktivierte Keratinozyten .....	43
3.3.2.1	Wirkung von Ciclosporin A auf die Expression von CD54 und CD80 auf IL-17 stimulierten Keratinozyten .....	46
3.3.3	Wirkung von Ciclosporin A auf hBD-2 in Keratinozyten.....	47

3.3.3.1	Einfluss von Ciclosporin A auf IL-17 induziertes hBD-2 in Keratinozyten .....	47
3.3.3.2	Einfluss von Ciclosporin A auf IL-22 induziertes hBD-2 in Keratinozyten .....	48
3.3.3.3	Einfluss von Tacrolimus auf IL-22 induziertes hBD-2 in Keratinozyten .....	52
3.3.4	Wirkung von Ciclosporin A auf die Filaggrinexpression in Keratinozyten nach Stimulation mit IL-4 und IL-13.....	54
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>57</b>
4.1	Wirkung von Ciclosporin A auf T-Lymphozyten .....	57
4.1.1	Einfluss von Ciclosporin A auf CLA <sup>+</sup> - und CCR6 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	57
4.1.2	Einfluss von Ciclosporin A auf IL-17, IL22 und IL-23R.....	59
4.2	Wirkung von Ciclosporin A auf Th17-Zellen.....	60
4.2.1	Polarisierungsmuster.....	60
4.2.2	Einfluss von Ciclosporin A auf die IL-17- und IL-22-Produktion .....	61
4.3	Wirkung von Ciclosporin A auf Keratinozyten .....	61
4.3.1	Einfluss von Ciclosporin A auf Membranmoleküle von Keratinozyten .....	62
4.3.2	Einfluss von Ciclosporin A auf die hBD2-Produktion in Keratinozyten .....	63
4.3.3	Einfluss von Ciclosporin A auf die durch IL-4 und IL-13 reduzierte Filaggrinexpression .....	65
4.4	Fazit und Ausblick.....	65
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>SCHRIFTENVERZEICHNIS.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>90</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	90
7.2	Tabellenverzeichnis .....	94
7.3	Abbildungsverzeichnis .....	95
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>97</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Haut und ihre Funktion

Die wichtigste Funktion der Haut ist die Bildung einer effektiven Barriere zwischen dem inneren Milieu und äußeren Umweltfaktoren. Die Cutis, bestehend aus Epidermis und Dermis, umfasst dabei die physische, aber auch biochemische (antimikrobielle, angeborene) Barriere sowie das adaptive Immunsystem.<sup>1</sup> Störungen in diesem immunologischen Gleichgewicht sind ein wichtiger Baustein in der Pathogenese von dermatologischen Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis (AD) und Psoriasis.

### 1.1.1 Epidermis

#### 1.1.1.1 Die Zellen der Epidermis – Keratinozyten

Keratinozyten bilden die zelluläre Basis der Epidermis. Sie sind umgeben von extrazellulären fettangereicherten Schichten, sodass nach außen eine wichtige Basisbarriere gegen chemische sowie mechanische Kräfte, Wasserverlust und Mikroben entsteht.<sup>1</sup> Keratinozyten sind aktiv an der Immunantwort beteiligt, indem sie z.B. MHC-Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren und inflammatorische Mediatoren sezernieren. Im normalen, nicht-entzündlichen Zustand, sind es ausschließlich MHC-Klasse-I-Moleküle, die primär an der Aktivierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup>-Zellen beteiligt sind. Im Entzündungsstadium kommt es durch das von T-Lymphozyten sezernierte IFN- $\gamma$  allerdings auch zur Ausbildung von MHC-Klasse-II-Molekülen, vor allem HLA-DR, über das auch CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aktiviert werden können.<sup>2-4</sup> Im immunologisch aktiven Zustand geben Keratinozyten v.a. das Zytokin IL-1 ab, das unter anderem Neutrophile, B- und T-Lymphozyten aktiviert.<sup>5</sup>

Weiterhin bilden Keratinozyten an ihrer Oberfläche konstitutiv das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 (CD54) aus, dessen Expression durch das von T-Lymphozyten sezernierte IFN- $\gamma$  verstärkt werden kann.<sup>6</sup> Über Konjugation von ICAM-1 mit LFA-1 auf T-Lymphozyten kommt es zu einer Interaktion zwischen Keratinozyten und T-Lymphozyten.<sup>7</sup> Darüber hinaus sorgen Keratinozyten für eine Balance in der Besiedelung der Haut mit Mikroorganismen durch Bildung antimikrobieller Peptide wie hBD-2.<sup>8</sup>

### 1.1.1.2 Aufbau der Epidermis – „cornified envelope“

Die Zellproliferation in der Epidermis ist auf das innere Stratum basale limitiert. Nach der Zellteilung verlassen die Tochterzellen den Zellzyklus und migrieren aufwärts, um das Stratum spinosum zu bilden. Dort werden Zellverbindungen verstärkt und zusätzlich Keratinproteine ausgebildet.<sup>9</sup> Die nächste Schicht, das Stratum granulosum, enthält dicht gepackte zytoplasmatische Körnchen mit hauptsächlich Profilaggrin<sup>10</sup> sowie weiteren Proteinen, die zur Bildung der oberflächlichen Hornschicht, des Stratum corneum, unerlässlich sind. Filaggrin (FLG) ist ein hoch-lösliches Protein, das durch seine Eigenschaft *in vitro* intermediäre Keratin-Filamente zu kondensieren, seinen Namen erhielt (*Filament aggregierendes Protein*).<sup>11</sup> Es besteht aus zwei Teilen, nämlich einem Filaggrin- sowie einem Proprotein, dem Profilaggrin. Die Epidermis von Menschen, die homozygot für eine Null-Mutation in FLG sind, ist gekennzeichnet durch völlige Abwesenheit dieser Granula.<sup>12</sup> In der Übergangszone vom Stratum granulosum zum Stratum corneum findet ein aktiver Prozess statt, getriggert durch Dephosphorylierung und einer Proteasen-Kaskade, der aus dem inaktiven Profilaggrin aktive Filaggrinmonomere freisetzt.<sup>13</sup> Diese verbleiben als Endprodukt der Kaskade im residualen Zytoplasma der Zellen des Stratum corneum. Ihre Funktion ist die Vernetzung und Abflachung der Keratinozyten und somit die Bildung einer proteolipidreichen Hülle („cornified envelope“), die die Barriere der Haut zur äußeren Umgebung darstellt.<sup>14</sup>

## 1.2 Immunsystem der Haut

### 1.2.1 Angeborenes Immunsystem – antimikrobielles Peptid hBD-2

Die angeborene Immunität ist wichtig für die Initiierung einer Abwehrreaktion auf als vom Körper eingestufte Pathogene. Sie ist zu großen Teilen genetisch determiniert. Neben FLG als Peptid der angeborenen Immunität ist auch hBD-2 an der Pathogenese von atopischer Dermatitis und Psoriasis beteiligt und wird im Folgenden näher erläutert.

HBD-2 ist ein kleines kationisches Peptid, das zur Gruppe der antimikrobiellen Peptide (AMPs), im Speziellen der Gruppe der  $\beta$ -Defensine, gehört und ursprünglich in psoriatischen Hautproben entdeckt wurde.<sup>8</sup> Hautproben von gesunden Menschen hingegen enthalten nur geringe Mengen an hBD-2. Die Induktion von hBD-2 in Kera-

tinozyten findet durch endogene und/oder exogene Stimulation statt. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$ , ebenso wie Bakterien, v.a. *Staphylococcus aureus* (Gram-positiv) und *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativ), führen zu einer deutlich gesteigerten Produktion von hBD-2.<sup>8 15</sup> Eine signifikante Steigerung der hBD-2-Produktion erfolgt auch durch die Zytokine IL-17 und IL-22.<sup>16</sup> In Ultrastruktur-Analysen konnte gezeigt werden, dass hBD-2 zusammen mit vorgeformten lipoiden Komponenten in den Lamellarkörperchen des Stratum spinosum gespeichert wird. Des Weiteren befindet sich hBD-2 in den Interzellularräumen der Epidermis, wo es sich lokal so stark anreichern kann, dass es effektiv mikrobielles Wachstum verhindert.<sup>17</sup> Zusätzlich zu seiner Funktion als antibiotisches Peptid ist hBD-2 als Link zwischen angeborener und adaptiver Immunität zu sehen, da es über den Membranrezeptor CCR6 auf u.a. dendritische Zellen (DCs) und T-Lymphozyten eine selektive chemotaktische Aktivität zeigt. Somit kann hBD-2 eine adaptive Immunantwort durch Rekrutierung von DCs und Memory-T-Zellen zum Ort der mikrobiellen Besiedelung über Interaktion mit CCR6 begünstigen.<sup>18</sup>

### 1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Eine adaptive Immunantwort erfordert die Aktivierung von naiven T-Lymphozyten, die ein fremdes Antigen von einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) in Form eines Peptid:MHC-Komplexes präsentiert bekommen müssen. Die wichtigsten APCs sind die DCs. MHC-Moleküle beim Menschen, auch HL-Antigene genannt, sind Zelloberflächen-assoziierte Glykoproteine, von denen zwei Klassen, MHC I und II, existieren. Sie binden Proteinfragmente, die entweder innerhalb der Zelle synthetisiert worden sind (MHC-Klasse I: HLA-A, HLA-B und HLA-C), oder präsentieren exogene Antigene, die aus dem extrazellulären Raum mittels Phago- oder Endozytose aufgenommen und proteolytisch prozessiert wurden (MHC-Klasse II: HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ).<sup>19</sup> Die Präsentation erfolgt in den Lymphknoten, wo die präsentierten HLA-Antigene auf den DCs über den T-Zell-Rezeptor (TCR) auf T-Lymphozyten oder über zellwandständige Immunglobuline auf B-Lymphozyten erkannt werden. Die vollständige Aktivierung von T-Zellen erfolgt nur durch Ko-Stimulation von CD28 auf T-Zellen mit CD80 und CD86 auf DCs und anderen APCs.<sup>20</sup> Auf diese Weise wird die T-Zelle zur Vermehrung und Differenzierung angeregt, sodass T-Effektorzellen entstehen. Abhängig vom Peptid:MHC-Komplex bilden sich entweder CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die u.a. die humorale Immunantwort induzieren oder die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die

virusinfizierte Zellen zerstören. Die maßgebliche Rolle fällt allerdings den durch MHC-Klasse II-Molekülen induzierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu, die weiter in T-Helferzell-Untergruppen (Th-Zellen) klassifiziert werden können.<sup>19</sup> Nach Ablauf einer Immunreaktion verbleiben die antigenspezifischen T-Zellen als sogenannte CD45RO<sup>+</sup>-Memory-Zellen im Organismus, damit im Falle eines erneuten Antigenkontaktes eine sekundäre Immunantwort schneller und effizienter gebildet werden kann.<sup>21</sup> CD45RO<sup>+</sup>-Memory-T-Zellen können das Membranmolekül CLA („cutaneous lymphocyte antigen“) exprimieren, das ihnen die Eigenschaft des „skin homing“ verleiht. Zusammen mit Adhäsionsmolekülen, Enzymen und Chemokinrezeptoren trägt es wie ein Barcode dazu bei, dass die Zellen in die Epidermis migrieren können.<sup>22</sup>

### 1.2.2.1 Subgruppen von T-Helfer (Th)-Zellen

CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen können je nach ihrem sezernierten Zytokinmuster in verschiedene Subgruppen eingeteilt werden. Neben den klassischen Th1- und Th2-Zellen werden die in der Pathogenese von Psoriasis und atopischer Dermatitis bedeutenden Subgruppen der Th17- und Th22- Zellen dargestellt.

#### 1.2.2.1.1 Th1/Th2

Klassischerweise werden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in Abhängigkeit von ihrem Zytokinprofil dem Th1- oder Th2-Subtyp zugeordnet.<sup>23 24</sup> Ausgehend von naiven Th0-Zellen entwickeln sie sich durch Polarisierung entweder in Th1- oder in Th2-Zellen.<sup>25</sup> Gereifte Th1-Zellen sezernieren u.a. IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , während Th2-Zellen IL-4, IL-5 und IL-13 abgeben.<sup>26</sup> Th1-Zellen mit ihrem charakteristischen proinflammatorischen Zytokin IFN- $\gamma$  stimulieren die Phagozytose<sup>27</sup>, den oxidativen Burst<sup>28</sup> und die intrazelluläre Beseitigung von Mikroben<sup>29 30</sup> und stellen somit einen wichtigen Bestandteil der zellulären Immunität dar.

Weiterhin reguliert IFN- $\gamma$  die Expression von MHC-Molekülen Klasse I<sup>31</sup> und II<sup>32</sup> auf einer Vielzahl von Zellen herauf, wodurch die Antigenpräsentation auf T-Zellen gefördert wird. Keratinozyten reagieren auf die Stimulation durch IFN- $\gamma$  mit der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und Chemokinen.<sup>33</sup> Ferner stimulieren sie auf Endothelzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen. Zusammen mit der Induktion einer Endothelzell-Retraktion und Relaxation der Gefäßmuskulatur können so Leukozyten in das umliegende Gewebe austreten und weitere Immunzel-

len zum Entzündungsherd rekrutieren. Th1-Zellen verursachen somit die Kardinalzeichen einer Entzündung: Rubor, Tumor, Dolor, Calor und ggf. Functio laesa.<sup>34</sup>

Im Gegensatz dazu stimulieren Th2-Zellen hohe Titer von Antikörpern und bilden somit die humorale Immunität mit der Abwehr von parasitären Infektionen.<sup>35</sup> Die Markerzytokine IL-4 und IL-13 aktivieren die B-Zell-Proliferation, Antikörperproduktion und den Isotypen-Switch.<sup>36 37</sup> Der durch IL-4 und IL-13 ausgelöste Switch von IgG zu IgE ist ein Zeichen für die Präsenz von Th2-Zellen.<sup>38</sup> Atopische Dermatitis und Asthma sind stark mit der Präsenz von Th2-Zellen assoziiert, deren Zytokine neben einer erhöhten Anzahl von IgE und Eosinophilen bei erkrankten Patienten nachweisbar sind.<sup>39-42</sup>

Th1- und Th2-Zellen regulieren sich bzw. supprimieren ihre Expansion gegenseitig. Das von Th1-Zellen sezernierte IFN- $\gamma$  unterdrückt die IL-4-Sekretion und inhibiert somit die Differenzierung von naiven Th0-Zellen in Th2-Zellen.<sup>43 44</sup> Auf der anderen Seite inhibiert IL-4 die Sekretion von IFN- $\gamma$  und blockiert somit die Polarisierung von Th0- in Th2-Zellen.<sup>45</sup>

#### 1.2.2.1.2 Th17

Th17-Zellen zeichnen sich durch die Produktion der Zytokine IL-17A, IL-17F sowie IL-22 aus.<sup>16</sup> Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie den Chemokinrezeptor CCR6, über den T-Lymphozyten in die Haut oder Mukosa gelockt werden können („skin homing“).<sup>46</sup> IL-17A, das initial entdeckte Zytokin der IL-17-Zytofamilie, bindet als Homodimer oder Heterodimer mit IL-17F an seinen Rezeptor IL-17RA. Man findet IL-17R ubiquitär auf Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, DCs sowie T-Lymphozyten im peripheren Blut.<sup>47 48</sup> Die Bindung führt über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie u.a. IL-8 und IL-6 durch Keratinozyten.<sup>33 49 50</sup>

Ein wichtiger Effekt von IL-17 auf Keratinozyten ist die Induktion von  $\beta$ -Defensinen, vor allem hBD-2<sup>16</sup> sowie die Heraufregulation von IFN- $\gamma$ , was zu einer erhöhten Expression von ICAM-1 auf Keratinozyten führt. Eine Th17-Immunantwort hängt entscheidend von externen und internen Stimuli des lokalen Milieus ab. Externe Stimuli sind häufig infektiöse Erreger, z.B. Bakterien<sup>51</sup> oder Pilze<sup>52</sup>, deren spezifische Moleküle, auch PAMPs genannt, die Differenzierung von naiven T-Zellen in Th17-Zellen induzieren. Diese erfolgt durch interne Stimuli mit TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-21 und IL-23.

Abhängig von der Präsenz von TGF- $\beta$  können durch unterschiedliche Polarisierungsmuster zwei Untergruppen von Th17-Zellen entstehen. In Anwesenheit von TGF- $\beta$  und IL-6 entstehen eher „klassische“ Th17-Zellen, während sich in Abwesenheit von TGF- $\beta$  durch IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-23 „alternative“ Th-17-Zellen aus naiven T-Zellen differenzieren.<sup>53-55</sup> Die relative Menge an TGF- $\beta$  und IL-23/IL-1 $\beta$  bestimmt zusammen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, welche Art Th17-Zellen entstehen.

### 1.2.2.1.3 Th22

IL-22, ursprünglich als IL-10-verbundener T-Zell-induzierender Faktor (IL-TIF) beschrieben, gehört zur Gruppe der IL-10-Zytokinfamilie.<sup>56</sup> IL-22 bindet an den IL-22R, der ausschließlich auf nicht-hämatopoetischen Gewebezellen exprimiert wird, z.B. auf Zellen des Atmungs- und Verdauungstraktes und auf Keratinozyten der Haut, jedoch nicht auf Immunzellen.<sup>57</sup> Es gibt außerdem ein neutralisierendes IL-22BP („binding protein“), das durch Bindung von IL-22 dessen Wirkung aufheben und antagonisieren kann. Es wird vor allem von DCs, T- und B-Zellen und Mastzellen ausgebildet.<sup>58</sup> IL-22-produzierende Zellen wurden zunächst als eine Variante der Th17-Zellen angesehen, sind jedoch eine eigenständige Subgruppe und werden als Th22-Zellen bezeichnet.<sup>59 60</sup> IL-22 wird demnach von Th22- und Th17-Zellen produziert.<sup>60</sup> Wolk et al. konnten zeigen, dass in den Th-Subgruppen IL-22 primär von den CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Memory-Zellen abgegeben wird. Dabei zeigten Th1-Zellen im Gegensatz zu Th2-Zellen eine erhöhte Expressionsrate.<sup>57 60 61</sup> Genau wie Th17-Zellen exprimieren sie auch den Oberflächenmarker CCR6.<sup>62</sup> Im Entzündungsstadium findet man Th22-Zellen daher vermehrt in der Haut, wo sie neben IL-22 auch TNF- $\alpha$ , jedoch kein IL-17, IL-4 und IFN- $\gamma$  abgeben.<sup>60 62 63</sup>

Th22-Zellen haben multiple Effekte auf Keratinozyten. IL-22 triggert die Produktion von AMPs, u.a. hBD-2<sup>57</sup>, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als durch IL-17<sup>64</sup>, sowie die Expression von Proteinen zur Zellproliferation und Migration von Keratinozyten.<sup>65 66</sup> Auf FLG und die Enzyme, die das Profilaggrin prozessieren, wirkt IL-22 herunterregulierend.<sup>67</sup> Auf der anderen Seite induziert IL-22 eine Akanthose und Hypergranulose in der Haut, indem Gene zur terminalen Differenzierung herunterreguliert werden.<sup>49 68</sup> Somit haben Th22-Zellen neben der proinflammatorischen Wirkung durch Synergismus von IL-22 und TNF- $\alpha$ <sup>66</sup> auch einen protektiven und regenerativen Effekt.<sup>49 63</sup>

## 1.3 Atopische Dermatitis

### 1.3.1 Epidemiologie, Klinik

Die atopische Dermatitis (AD), auch Neurodermitis genannt, ist eine weit verbreitete chronisch-entzündliche Hauterkrankung. Sie kann Kinder (15-30%) und Erwachsene (2-10%) betreffen und zeigt sich klinisch als chronisch rezidivierende Dermatitis, gepaart mit deutlichem Juckreiz.<sup>69 70</sup> Es wird geschätzt, dass die Anfälligkeit eine AD zu entwickeln zu 82% durch genetische bzw. 18% durch Umweltfaktoren erklärt werden kann.<sup>71</sup>

Die AD hat ein großes Spektrum von milden über mittelschwere bis schwere Formen. Häufig beginnt die Erkrankung im Säuglings- oder frühen Kindesalter („early-onset“ AD), einhergehend mit einer Prädisposition für die Entwicklung von Asthma oder allergischer Rhinitis.<sup>72</sup> Diesen Verlauf bezeichnet man als „atopischen Marsch“. Die AD kann auch erst im Erwachsenenalter beginnen („late-onset“ AD) und bei beachtlich vielen dieser Patienten ist keine IgE-Sensibilisierung nachweisbar, die bei der early-onset AD häufig früh eintritt.<sup>73 74</sup>

Klinisch können sich ekzematöse, häufig stark juckende Läsionen an Arm- und Kniebeugen sowie am Nacken und an den Innenseiten der Extremitäten zeigen. Persistierende Läsionen führen im chronischen Stadium zu lichenifizierten Plaques mit verdickter, hypertrophierter Haut. Der Schweregrad der Erkrankung kann über den SCORAD-Index bestimmt werden. Er kombiniert objektive Kriterien (Ausbreitung und Intensität der Läsionen) und subjektive Kriterien (Juckreiz am Tag und Schlafstörungen).<sup>75</sup> Eine leichte atopische Dermatitis liegt bei einem Gesamt-SCORAD-Score von bis zu 25 Punkten, eine mittelschwere bei 25 bis 50 Punkten und eine schwere bei über 50 Punkten vor.<sup>76</sup>

### 1.3.2 Pathogenese

Die Erklärungsansätze für die Pathogenese von AD verbinden Barriedefekte, eine Dysregulation des Immunsystems sowie eine erhöhte Rate an Kolonisation der Haut mit bestimmten Erregern. Ursache und Folge werden in zwei Hypothesen diskutiert. Die „outside-in“-Hypothese geht von einer Dysfunktion der epidermalen Barriere aus, die zu einer Aktivierung des Immunsystems führt. Die „inside-out“-Hypothese sieht

die AD als eine Zytokin-getriebene Erkrankung, die eine reaktive epidermale Hyperplasie zur Folge hat.<sup>77 78</sup>

Mutationen des FLG-Gens sind stark mit AD assoziiert.<sup>79</sup> Das Risiko der Entstehung einer AD ist bei Filaggrinmutationen deutlich erhöht (Odds Ratio 3,1–4,8).<sup>80</sup> Null-Mutationen werden mit 50% der moderaten bis schweren Formen der AD in Verbindung gebracht, jedoch nur 15% der milden bis moderaten Formen sind mit FLG-Mutationen assoziiert.<sup>81</sup> Ein Mangel an FLG führt zu reduziertem Feuchtigkeitsgehalt im Stratum corneum und erhöhtem transepidermalen Wasserverlust (TEWL)<sup>80</sup> sowie verminderter Produktion des „Natural Moisturizing Factor“ (NMF), was wiederum zu einem erhöhten pH-Wert führt.<sup>82 83</sup> Die Homöostase der epidermalen Barriere ist somit gestört und erleichtert die Penetration von Allergenen, was in einer allergischen Sensibilisierung resultieren kann.<sup>84</sup> Die Allergene dringen bis in die subepidermalen Schichten vor und erhalten dort Kontakt zu APCs, was die Initiierung einer Immunantwort zur Folge hat.<sup>85</sup>

Die akute Phase der AD ist geprägt von einem Th2-Zytokinmuster. Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-13 sind in betroffener sowie auch nicht-betroffener Haut von AD-Patienten erhöht zu finden. Th2-Zellen lösen in den lymphatischen Organen einen Isotypen-Switch zu IgE aus, begünstigen somit die Differenzierung von Eosinophilen und regulieren die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen herauf.<sup>74</sup><sup>86</sup> IL-4 und IL-13 regulieren die FLG-Expression ebenso wie die Bildung des antimikrobiellen Peptids hBD-2 in Keratinozyten herunter und haben somit direkten Einfluss auf die angeborene Immunantwort.<sup>87-89</sup>

Die Haut bei Patienten mit AD ist bis zu 87% mit *Staphylococcus aureus* kolonisiert, bei gesunden Probanden ist der Keim jedoch nur in 5–30% der Fälle nachweisbar.<sup>90</sup><sup>91</sup> Das von *S. aureus* sezernierte Enterotoxin B (SEB), das für das Immunsystem ein Superantigen darstellt, aktiviert Th-17-Zellen, die im peripheren Blut sowie in akuten AD-Läsionen erhöht sind. Diese regulieren die Abgabe von ihrem Hauptzytokin IL-17 als Antwort auf die Stimulation durch SEB deutlich herauf.<sup>92-94</sup> Die Folge ist zwar eine erhöhte Produktion von AMPs durch Keratinozyten, jedoch scheint die herunterregulierende Wirkung der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 auf die Bildung von insbesondere hBD-2 und IL-17 zu überwiegen, sodass Patienten mit akuter und chronischer AD einen relativen Mangel an manchen AMPs aufweisen. Daraus kann eine erhöhte Rate an chronisch bakteriellen Hautinfektionen resultieren.<sup>64 94-96</sup>

Die chronische Phase der AD wiederum ist durch eine von Th1-Zellen dominierte Immunantwort gekennzeichnet. Chronische Läsionen sind durch Th1-Zellen charakterisiert, die vor allem IFN- $\gamma$  abgeben. IFN- $\gamma$  führt zu einem Th1/Th2-Ungleichgewicht und schließlich von einem Th2-dominierten Milieu zu einem Th1-Switch.<sup>86 97</sup> Th1-Zellen gelten als Promoter der chronischen Entzündungsreaktion und führen zum Gewebeumbau und Fibrose. In diese Prozesse sind u.a. die durch IFN- $\gamma$  ausgelöste Apoptose von Keratinozyten involviert sowie Alterationen durch IL-11, TGF- $\beta$ 1 und IL-17, das jedoch in der chronischen Phase der AD eine eher untergeordnete Rolle spielt.<sup>59 93 97-100</sup>

Th1-Zellen schütten weiterhin das Chemokin CCL20 aus und rekrutieren damit CCR6<sup>+</sup>-Zellen wie unreife DCs und Memory-T-Zellen zum Läsionsort.<sup>101</sup> CCL20 und SEB erhöhen die Expression und Ausschüttung von IL-22, das in der chronischen AD erhöht exprimiert wird und positiv mit dem Schweregrad assoziiert ist.<sup>59 102</sup> Die Entdeckung von IL-22 führte zu einem neuen Ansatz im Verständnis der chronischen Hautveränderungen der AD, da IL-22 die epidermale Hyperplasie und Akanthose fördert und somit das klassische Symptom der Lichenifikation erklären kann.<sup>59 68</sup>

## 1.4 Psoriasis

### 1.4.1 Epidemiologie, Klinik

Die Psoriasis ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die weltweit 1-3% der Menschen betrifft. Im Gegensatz zur AD hat sich die Inzidenzrate in den letzten Jahrzehnten nicht signifikant verändert.<sup>103-105</sup> Psoriasis tritt familiär gehäuft auf. Die Krankheit entwickelt sich bei der Hälfte aller Geschwister, wenn beide Eltern betroffen sind. Bei einem erkrankten Elternteil fällt diese Wahrscheinlichkeit beim Kind zu erkranken auf 16% und diese sinkt nochmals auf 8%, wenn beide Eltern nicht an Psoriasis leiden.<sup>106-108</sup>

Die klassische Psoriasis, auch Psoriasis vulgaris genannt, ist mit 90% die häufigste Form. Klinisch zeigen sich klar umschriebene, trockene, rote Plaques mit dicken, teilweise adhärennten silbrig-weißen Hautschuppen. Die Lokalisation ist typischerweise an den Gelenken, vor allem an Ellenbogen und Knien sowie auch am Kopf und am unteren Rücken.<sup>109</sup> Der Anteil an betroffener Haut wird in Prozent angegeben.

Als Referenz dient die Palmarfläche der Hand mit 1%. Bei ungefähr einem Drittel der Patienten ist mehr als 10% der Hautoberfläche betroffen. Ab diesem Stadium wird die Psoriasis als moderat bis schwer bezeichnet. Die Schwere der Erkrankung lässt sich weiterhin über den PASI („Psoriasis Area and Severity Index“) bestimmen. Nach diesem Score wird das Ausmaß der Rötung, die Dicke der Plaques sowie Schuppung in unterschiedlichen Bereichen des Körpers gemessen. Der maximale Wert des PASI beträgt 72. Der Index dient als Verlaufsparemeter zur Einschätzung eines Therapieerfolgs während der Behandlung.<sup>110</sup>

### 1.4.2 Pathogenese

Die Psoriasis kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Dazu zählen Verletzungen und Traumata, in diesem Zusammenhang als „Koebner Effekt“ bezeichnet<sup>111</sup>, sowie Infektionen und Medikamente.<sup>112</sup> Histologisch zeichnen sich psoriatische Hautläsionen durch charakteristische Veränderungen wie Akanthose und Parakeratose aus, bedingt durch eine überhöhte Proliferation von Keratinozyten mit einer 8-fach höheren Teilungsrate.<sup>113</sup> Das erythematöse Erscheinungsbild entsteht durch Erweiterungen der Blutgefäße im Stratum papillare der Dermis. Des Weiteren findet man ein dichtes entzündliches dermales Infiltrat aus T-Zellen sowie DCs.<sup>114</sup> Im frühen Erkrankungsstadium konnte der Entstehungsmechanismus über Aktivierung von plasmazytoiden DCs (pDCs) durch einen Komplex aus LL37 und DNA von zugrunde gegangenen Keratinozyten nachgewiesen werden. Im Aktivierungszustand schütten pDCs u.a. IFN- $\alpha$  und - $\beta$ <sup>115-117</sup> aus, welche einen Reifungsstimulus für eine weitere Untergruppe der DCs – die dermalen myeloiden DCs – darstellen.<sup>118</sup> Diese wiederum können auch direkt über einen Komplex aus LL37/RNA aktiviert werden und produzieren IL-23, TNF- $\alpha$  und IL-6.<sup>117 119</sup> Läsionale psoriatische Haut enthält einen 30-fach höheren Anteil an dermalen DCs im Verhältnis zu gesunder Haut.<sup>118</sup> Diese führen nun zu einer Aktivierung und Differenzierung verschiedener T-Zell-Untergruppen.<sup>120</sup> Die meisten Psoriasis-assoziierten T-Zellen sind CD45RO<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> und haben oberflächlich den Aktivierungsmarker HLA-DR.<sup>121 122</sup>

Die Psoriasis wurde ursprünglich als eine Erkrankung angesehen, die von einer Th1-Immunantwort dominiert wird. Austin et al. konnten zudem zeigen, dass Psoriatiker ein verändertes Th1-Profil mit einer erhöhten Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aufweisen. Über die Ausschüttung von Chemokinen durch Keratinozyten und DCs mig-

rieren sie zum Läsionsort.<sup>123 124</sup> Später erst entdeckte man, dass auch Th17-Zellen an der Pathogenese entscheidend beteiligt sind.<sup>125</sup>

Psoriatische Läsionen enthalten eine erhöhte Menge an IL-23<sup>119 126 127</sup> wie auch Th17-Zellen und IL-17<sup>125 128</sup> im Verhältnis zu nicht-läsionaler Haut und gesunden Hautproben. Psoriatiker weisen ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Th17-Zellen im Vergleich zu Gesunden im Blut auf, welche mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert sind.<sup>129 130</sup> Das von aktivierten DCs sowie von Makrophagen ausgeschüttete IL-23 ist als wichtiger Regulator an der Polarisierung von Th17-Zellen *in vivo* beteiligt.<sup>131 132</sup> Die Ausschüttung von IL-17 führt nicht nur zu einer Heraufregulation von AMPs durch Keratinozyten, insbesondere hBD-2<sup>16</sup>, sondern verstärkt zusammen mit TNF- $\alpha$  auch deren Reaktion auf inflammatorische Zytokine.<sup>133</sup> Ferner aktiviert IL-17 über die Ausschüttung von IL-6 und IL-8 durch Keratinozyten Neutrophile und verstärkt die Angiogenese. Dieser Effekt wird über einen Synergismus mit dem Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  nochmals verstärkt.<sup>33 134 135</sup>

Neben IL-17 spielt auch IL-22 eine wichtige pathogenetische Rolle. Das Serum von Psoriatikern enthält erhöhte Konzentrationen an IL-22.<sup>136</sup> Zudem weist das periphere Blut eine gesteigerte Anzahl an Th22-Zellen auf<sup>130</sup> und auch die Läsionen enthalten eine erhöhte Menge an IL-22-mRNA im Verhältnis zu gesunden Proben.<sup>59 137</sup> Weiterhin wurde eine Korrelation von IL-22-Serumspiegeln mit dem PASI-Score beschrieben.<sup>138</sup> Die Bindung von IL-22 an seinen Rezeptor auf Keratinozyten führt zu dem histologisch typischen Bild der epidermalen Hyperplasie mit Ankanthose und Hypergranulose.<sup>139</sup> In einem etwas geringeren Ausmaß als IL-17 induziert IL-22 die hBD-2-Produktion in Keratinozyten.<sup>16</sup>

IL-22 wirkt weiterhin als Verstärker der Entzündungsreaktion, indem es die Expression von durch TNF- $\alpha$  induzierten Chemokinen von Keratinozyten nochmals erhöht, allein jedoch diese Wirkung nicht induzieren kann.<sup>63</sup>

## 1.5 Calcineurin-Inhibitoren

### 1.5.1 Ciclosporin A

Erstmals wurde Ciclosporin A (CsA) im Jahre 1970 aus dem Bodenpilz *Tolypocladium Inflatum* (Gams) von Jean-François Borel und Hartmann Stähelin im schweizeri-

schen Sandoz Labor in Basel isoliert. Während es zunächst schien, als hätte CsA nur ein sehr schmales antimykotisches Spektrum, wurde 1976 seine Bedeutung als starker Inhibitor der T-Zell-Aktivierung deutlich.<sup>140 141</sup> In diesem Zusammenhang verhinderte zwei Jahre später der Einsatz von CsA erstmals erfolgreich die Abstoßung einer Niere bei Patienten mit Zustand nach nicht-gematchter Nierentransplantation.<sup>142</sup>

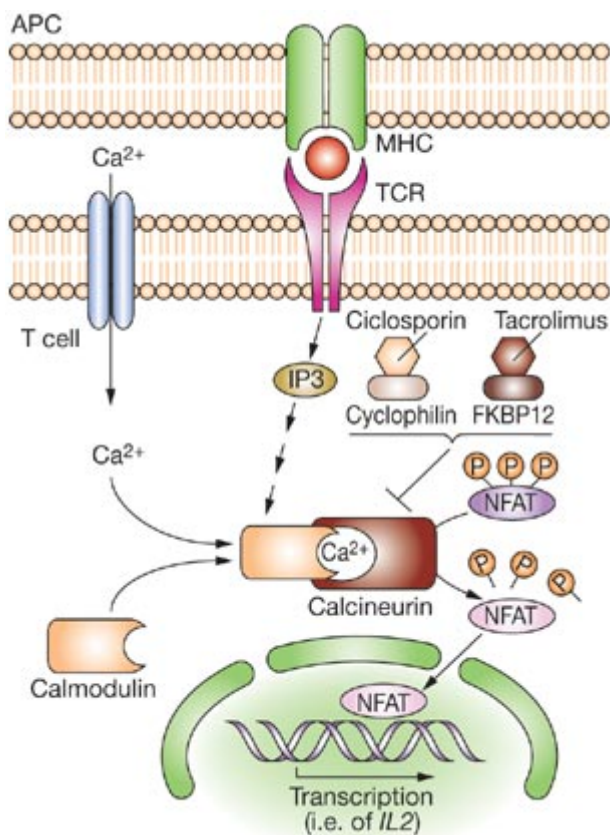
CsA ist ein lipophiles zyklisches Polypeptid, bestehend aus 11 Aminosäuren und einem molekularen Gewicht von 1203,6 D.<sup>143</sup> CsA ist ein Prodrug, das oral oder intravenös verabreicht werden kann und erst dann aktiv wird, wenn es mit endogenen, intrazellulären Rezeptoren oder Bindungsproteinen, den Immunophilinen, komplexiert. Erst dieser Komplex aus CsA und seinem spezifischen Rezeptor Cyclophilin bindet mit hoher Affinität an sein Zielmolekül, die Proteinphosphatase Calcineurin.<sup>140 144</sup>

Calcineurin ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ - und Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Phosphatase, die aus zwei Untereinheiten besteht<sup>145</sup> und in Säugetieren vor allem im Gehirn<sup>146</sup> und in T-Zellen vorkommt.<sup>147 148</sup> Sie ist eine essentielle Komponente des T-Zell-Aktivierungsweges und bindet an NFAT<sub>c</sub>.<sup>144 149</sup> Die Blockierung hat eine komplette Inhibition der Translokation von NFAT<sub>c</sub> vom Zytoplasma in den Zellkern zur Folge.<sup>150</sup> Somit bleibt die NFAT-Bindungsstelle im Zellkern frei und es kommt zu einer stark reduzierten T-Zell-Aktivierung und die Transkription von Zytokingenen wie IL-2, IFN- $\gamma$ , G-CSF, M-CSF, IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$  und Membranproteinen wie CD154 ist stark reduziert.<sup>151 152</sup> CsA verhindert somit nach Bindung an Calcineurin die Transkription von diesen Genen und damit effektiv die T-Zell-Aktivierung. Borel et al. konnten zudem in ihren Experimenten nachweisen, dass CsA in wirksamer T-Zell-inhibitorischer Konzentration nicht zelltoxisch ist und nicht die Proliferation anderer Zelltypen hemmt.<sup>153</sup>

### 1.5.2 Tacrolimus

Der Immunmodulator FK506, auch bekannt unter dem Namen Tacrolimus (Tcl), wurde erstmals 1984 aus dem Pilz *Streptomyces tsukubaensis* in Japan auf der Suche nach neuen immunmodulatorisch wirksamen Substanzen in der Transplantationsmedizin isoliert. Die Namensgebung erfolgte als Neologismus aus *tsukuba*, *macrolide* und *immunosuppression*.<sup>154</sup> Im Jahr 1989 wurde Tacrolimus erstmals erfolgreich bei

einem Leber-Transplantierten eingesetzt. <sup>155</sup> Tacrolimus gehört zu den hydrophoben Makroliden mit einem Gewicht von 822 D. Nachdem es die Zellmembran permeiert hat, bindet Tacrolimus an eine Klasse von FK506-bindenden Proteinen (FKBPs), welche zu den Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerasen gehören. FKBP12 gehört dabei zur wichtigsten Isomerase zur Bindung an Tacrolimus. Der Komplex aus FKBP12 und Tacrolimus bindet ebenso wie der Komplex aus Ciclosporin und Cyclophilin an Calcineurin und verhindert damit die Dephosphorylierung von NFAT. Somit wird die Transkriptionskaskade in T-Zellen unterbrochen und eine Transkription von proinflammatorischen Faktoren verhindert. <sup>156</sup> Zusätzlich verhindert Tacrolimus die Zytokinproduktion von Eosinophilen, Mastzellen und Basophilen und reduziert die Kapazität von DCs, wodurch ebenso eine T-Zell-Aktivierung verhindert wird. <sup>157-160</sup>



**Abb. 1: Wirkmechanismus von Ciclosporin A und Tacrolimus**

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd:  
 [Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology] (Fantini MC, Becker C, Kiesslich R, Neurath MF), copyright (2006)

## 1.6 Therapiestufen bei atopischer Dermatitis und Psoriasis

Die Therapieform und -intensität richtet sich nach dem Ausprägungsgrad und Schwere der Hautläsionen. Bei der AD geht es in der Basistherapie zunächst um nicht-pharmakologische Maßnahmen wie Reduktion von Triggerfaktoren sowie die Anwendung von Basistherapeutika, die hauptsächlich auf die Behandlung der Barrierefunktion und Trockenheit abzielen.<sup>161 162</sup> Ein ähnliches Prinzip gilt bei der Psoriasis, die ebenfalls initial mit Basistherapeutika wie topischen wirkstofffreien Salben oder Zusätzen mit Harnstoff, Salizyl- und Milchsäure behandelt wird.<sup>163 164</sup> Reichen die Basistherapeutika zur Reduktion der Symptome nicht aus, können topische Wirkstoffe indiziert sein. Bei der AD umfassen wichtige antiinflammatorische Wirkstoffe topisch angewandte Glukokortikoide und die Calcineurinantagonisten (TCIs) Tacrolimus und Pimecrolimus, die neben der Reduktion der Läsionen auch zu einem verminderten Pruritus beitragen.<sup>165</sup> Bei der Psoriasis kann ebenfalls bei unter Basistherapeutika persistierenden Läsionen die topische Anwendung von TCIs, Dithranol, allein oder in Kombination mit Glukokortikoiden und Vitamin D<sub>3</sub>-Derivaten zum Einsatz kommen.<sup>166-169</sup> Bei schweren Formen bzw. unter topischer Therapie unzureichendem Ekzem- bzw. Läsionsrückgang ist eine systemische Therapie indiziert. Bei der AD können in diesem schweren Stadium immunsupprimierende Wirkstoffe wie CsA, Azathioprin, Mycophenolatmofetil, Methotrexat (MTX) oder auch Biologika angewendet werden.<sup>165</sup> Auch bei der Psoriasis kommen CsA und MTX, jedoch auch Fumarsäureester, die Phototherapie (PUVA), Retinoide oder Biologika zum Einsatz.<sup>170</sup>

### 1.6.1 Klinische Anwendung von Tacrolimus

Tacrolimus als topischer steroidfreier Calcineurinantagonist wurde in Deutschland 2002 offiziell zugelassen und wird für die Behandlung als Second-Line-Kurzzeit-Therapie und als intermittierend chronische (proaktive) Therapie bei mittelschwerer bis schwerer AD eingesetzt.<sup>165 171</sup> TcI ist in Deutschland nur zur Therapie der atopischen Dermatitis zugelassen, wird aber auch zur Behandlung der Psoriasis außerhalb der Zulassung (Off-Label) eingesetzt. Klinische Studien konnten zeigen, dass okklusiv angewandtes Tacrolimus zu einer Besserung der Symptome führt.<sup>166</sup> TCIs haben einen besonderen Indikationsbereich in Körperregionen wie Gesicht, Beugen und der Genitalregion, da dort die Gefahr von unerwünschten Wirkungen (UAW) bei

Anwendung von Glukokortikoiden bei einer physiologisch dünneren Hautbarriere erhöht ist.<sup>172-175</sup> Somit kann die Anwendung von TCIs zu einer Einsparung von Glukokortikoiden führen. Die molekulare Struktur erlaubt eine effektive Penetration der Hautbarriere, die im Vergleich zu Glukokortikoiden jedoch bis zu 100-fach geringer ausfällt, sodass es zu deutlich weniger systemischen Nebenwirkungen kommt.<sup>176 177</sup> In Studien zur Anwendung bei AD konnte gezeigt werden, dass die Wirkstärke von Tci mindestens derer von mild bis moderat wirkenden Glukokortikoiden entspricht, jedoch schwächer als die von potenten Glukokortikoiden ist.<sup>178-181</sup> Auch bei der Psoriasis schnitt Tci im Vergleich zu anderen topisch angewandten Therapeutika wie Salizylsäure und Vitamin D<sub>3</sub> besser ab.<sup>182 183</sup> Das deutlich bessere Nebenwirkungsprofil kann u.a. dadurch erklärt werden, dass Tci nicht die Aktivität von Gewebe-Fibroblasten herunterreguliert, wodurch eine Hautatrophie selbst bei Langzeitanwendung verhindert wird. Eine häufig beschriebene UAW ist ein vorübergehendes Brennen auf der Haut nach Applikation, welches mit dem Abheilen der Läsionen jedoch nachlässt.<sup>171</sup> Tci kommt bei der systemischen Therapie der AD selten zum Einsatz, vermutlich aufgrund der Häufigkeit der UAW.<sup>184</sup>

In der systemischen Therapie der Psoriasis und der AD hat Tci trotz Wirkungsnachweis mangels Zulassung und wegen des unvorteilhaften Nebenwirkungsprofils keine Bedeutung.<sup>185</sup>

### **1.6.2 Klinische Anwendung von Ciclosporin A**

Wenn die Hautläsionen der AD und Psoriasis mit topischer Therapie trotz optimiertem Therapieplan und Adhärenz des Patienten nicht kontrolliert werden können, kann eine systemische Therapie in Betracht gezogen werden. Bei der AD können akute schwere Exazerbationen, schwere lokale Läsionen und Handekzeme eine Indikation darstellen.<sup>186</sup> Bei Erwachsenen werden etwa 10% aller Patienten zeitweilig systemisch behandelt, bei Kindern stellt die Indikation jedoch eine Ausnahme dar.<sup>165</sup> CsA ist derzeit der einzige zugelassene immunsupprimierende Wirkstoff zur systemischen Therapie der AD bei Erwachsenen, bei denen die konventionelle Therapie ineffektiv oder nicht anwendbar ist.<sup>172 187 188</sup> In den meisten Fällen ist eine Kurzzeittherapie ausreichend. Bei rezidivierenden Episoden kann eine Intervalltherapie mit niedrigen Dosen CsA über mehrere Monate angestrebt werden. Häufige Exazerbationen

können jedoch auch zu einer anhaltenden Therapiestrategie mit geringsten Dosen führen.<sup>189</sup>

Bei moderaten bis schwer therapieresistenten Formen der Psoriasis ist CsA ebenso einer der schnellsten und effektivsten Wirkstoffe, der seit 1993 offiziell für diesen Indikationsbereich zugelassen ist. CsA wird über einige Monate als Kurzzeittherapie, die bei Bedarf in Intervallen wiederholt werden kann, seltener als Langzeittherapie über einen Zeitraum von ein bis zwei Jahren eingesetzt.<sup>190 191</sup> CsA wirkt nach dem Absetzen durchschnittlich noch zwei bis drei Monate, sodass eine topische Therapie eine erneute Exazerbation der Läsionen verhindern kann.<sup>192</sup>

Eine Überwachung der Nierenfunktionsparameter sowie des Blutdrucks ist während der Therapie obligat, da CsA nierentoxisch ist und zu Hypertonie führen kann.<sup>189</sup> Aufgrund seiner Molekülgröße, die zu groß ist, um die Haut zu permeieren, kann CsA nicht topisch angewandt werden.<sup>193</sup> In der Ophthalmologie kommt CsA jedoch topisch in Augentropfenform zur Behandlung bei schwerer Keratitis zum Einsatz.<sup>194</sup>

## 1.7 Fragestellung, Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es neben der bereits bekannten immunsupprimierenden Wirkung von CsA auf T-Lymphozyten neue Wirkungen auf Th17-Zellen zu erforschen. Ebenso sollten direkte Wirkungen von CsA auf Keratinozyten, die bisher nicht beschrieben waren, untersucht werden. Pathogenetisch wichtige Zielmoleküle waren hier vor allem hBD-2 und FLG.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden zunächst CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen mittels IL-1 $\beta$  und IL-23 zu Th17-Zellen polarisiert und mit CsA inkubiert, um dann mit SEB stimuliert zu werden. Die Effekte auf die Regulation von IL-17 und IL-22 wurden daraufhin untersucht.

Des Weiteren wurden humane epidermale Keratinozyten aus juveniler gesunder Spenderhaut isoliert und das inflammatorische Milieu unter Laborbedingungen nachgestellt. Dazu wurden die Keratinozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen CsA vorinkubiert und mit IL-17 bzw. IL-22 stimuliert. Die Regulation der Zielmoleküle wurde auf mRNA-Ebene (LightCycler PCR) und Proteinebene (ELISA) untersucht. Bezüglich der Fragestellung eines Calcineurin-abhängigen Effekts wurden die Versuche mit einem weiteren Calcineurin-Inhibitor, dem Tacrolimus, wiederholt.

## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Medien, Puffer, Lösungen

Tab. 1: Zellkulturmedien

Name	Zusammensetzung
IAB Vollmedium	Basal Iscove Medium + Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) 1% + Gentamycin 10 mg/ml 0,5% + Penicillin/Streptomycin 10.000 IE/10.000 µg/ml + L-Glutamin 200 mM 1% + AB-Serum 4% 0,2 µm steril filtriert
Keratinocyten Vollmedium	Keratinocyte Basal Medium 2 + BPE-15 + hEGF – 0,0625 + HC – 165 + Insulin – 2,5 + Epinephrine – 195 + Transferrin – 5 + CaCl <sub>2</sub> – 0,5/0,06
Keratinocyten Medium	Keratinocyten Vollmedium - HC – 165
Stimulation	- hEGF – 0,0625

**Tab. 2: Puffer**

Name	Zusammensetzung	
Immunfluoreszenz	Gelatine	0,2 g
Waschpuffer	NaN <sub>3</sub> 2M	1 ml
	PBS (Lagerung bei 4°C)	ad 100 ml
Immunfluoreszenz	humanes IgG hitzeaggr.	50 mg/ml
Blockpuffer	Gelatine	1 g
	NaN <sub>3</sub> 2M	5ml
	PBS (Lagerung bei 4°C)	ad 500 ml
ELISA Waschpuffer	PBS	
	Tween <sup>®</sup> 20 (pH 7,4)	0,05%
ELISA Blockpuffer,	PBS	
ELISA Diluent (R&D)	BSA Stock Solution (pH 7,3)	1%
ELISA Diluent (PeproTech)	PBS	
	BSA Stock Solution	0,1%
	Tween <sup>®</sup> 20 (pH 7,3)	0,05%
MACS <sup>®</sup> -Puffer	PBS	
	EDTA 2 mM	
	AB-Serum (pH 7,3)	1%

**Tab. 3: Lösungen**

Name	Zusammensetzung
EDTA 0,02%	EDTA 1%ig
	PBS ad 50 ml
Hanks-Lösung	Hepes 20mM 20 ml
	Gentamycin 5 ml
	Amphotericin B 5 ml
	Aqua dest. ad 500 ml

### 2.1.2 Zytokine und Antikörper

**Tab. 4: Zytokine**

Name	Firma
Ciclosporin A	Sigma Aldrich, Steinheim
FK-506 monohydrate	Sigma Aldrich, Steinheim
rHu IFN- $\gamma$	R&D, Wiesbaden
rHu IL-1 $\beta$	PeptoTech, Hamburg
rHu IL-4	R&D, Wiesbaden
rHu IL-13	Promokine, Heidelberg
rHu IL-17	Immunotools, Friesoythe
rHu IL-22	PeptoTech, Hamburg
rHu IL-23	R&D, Wiesbaden
SEB	Toxin Technology, Florida (USA)

**Tab. 5: Antikörper**

Name	Fluoreszenz	Firma
CD3	FITC, PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD4	FITC, PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD8	FITC, PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD14	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD54	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD69	APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD80	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD86	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD154 (= CD40L)	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD196 (= CCR6)	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CLA	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
HLA-DR	APC	BD Biosciences, Heidelberg
7-AAD	PerCP	BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD3		HISS Diagnostics, Freiburg
anti-CD28		HISS Diagnostics, Freiburg

**Tab. 6: Primer**

Name	Firma
Filaggrin	Qiagen, Hilden
GAPDH	Qiagen, Hilden
HBD-2 for	TiB MOLBIOL, Berlin
HBD-2 rev	TiB MOLBIOL, Berlin
IL-20	Qiagen, Hilden

### 2.1.3 Reagenzien und Kits

**Tab. 7: Reagenzien**

Name	Firma
2M Schwefelsäure	Zentralapotheke Klinikum Region Hannover GmbH
AB-Serum	MHH-Blutbank, Hannover
ABTS Solution	Roche, Mannheim
Amphotericin B	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aqua dest. Milli-Q	Millipore, Schwalbach
autoMACS™ Rinsing Solution	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Basal Iscove Medium	BIOCHROM AG, Berlin
Brefeldin A	Sigma Aldrich, Steinheim
DEPC beh. Wasser für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
Dimethyl sulfoxide min. 99,5% GC	Sigma Aldrich, Steinheim
Dispase	Roche, Mannheim
DNA AWAY™	Molecular BioProducts, Karlsruhe
DPBS w/o Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
EDTA (VERSEN) 1%ig	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
Ethanol 70%	Fischar, Saarbrücken
Ethanol 96%	Fischar, Saarbrücken
Ethanol 99,8%	Roth, Karlsruhe
FACS Flow™	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACS™ Clean	BD Biosciences, Heidelberg

---

Name	Firma
Gelatine	Sigma Aldrich, Steinheim
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Heparin-Natrium-5000 ratiopharm®	Ratiopharm, Ulm
Hepes	Sigma Aldrich, Steinheim
Humanes IgG	Aventis Behring, Marburg
HyClone™ HyQTase™	Thermo Scientific, Karlsruhe
Ionomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Keratinocyte basal Medium 2	PromoCell, Heidelberg
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Lymphoprep™	Fresenius Kabi Norge AS, Oslo, Norwegen
Nicht-essentielle AS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
PMA	Sigma Aldrich, Steinheim
RNA Wash Buffer	ZYMO Research, Freiburg
Substrate Reagent Pack	R&D, Wiesbaden
Trypsin	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
Trypsininhibitor	PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
Türks Reagenz	Zentralapotheke Klinikum Region Hannover GmbH
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
ZR RNA Buffer	ZYMO Research, Freiburg

---

**Tab. 8: Kits**

Name	Firma
CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD45RO MicroBeads human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Human BD-2 Development Kit	PeptoTech, Hamburg
Human IL-17, DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development System	R&D, Wiesbaden
Human IL-20 Development Kit	PeptoTech, Hamburg
Human IL-22, DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development System	R&D, Wiesbaden
Human Th17 Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit	R&D, Wiesbaden
LightCycler <sup>®</sup> FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green I	Roche, Mannheim
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA XS Kit	Macherey-Nagel, Düren
QuantiTect <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Quick-RNA <sup>TM</sup> MiniPrep	ZYMO Research, Freiburg
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.1.4 Geräte

**Tab. 9: Laborgeräte**

Name	Firma
Autoklav TECNOCLAV 50	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Bench HERA safe™	Heraeus, Hanau
Bench NUAIRE	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Brutschrank HeraCell150	Heraeus, Hanau
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
FACS Calibur™	BD Biosciences, Heidelberg
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtechnologies, Offenburg
Gefriertruhe -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefriertruhe -80°C	GFL, Burgwedel
Heidolph Polymax 1040 Schüttelinkubator	Heidolph, Schwabach
Hettich Rotanta/RP	Hettich, Tuttlingen
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Ochsenhausen
LabDancer REAX 2000	IKA®, Staufen
LightCycler® 1.5	Roche, Mannheim
MACS® LS Column Magnetsäule	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS® Magnet Midi MACS™	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS® Magnetständer MULTI STAND	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mikroskop Zeiss	Zeiss, Jena
Mikroskop Zeiss Axiovert 10	Zeiss, Jena
NanoDROP™ 2000	Thermo Scientific, Karlsruhe
Neubauer Zählkammer	Superior, Marienfeld

---

Stickstofftank	Cryoson, Kleinkahl
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau

---

### 2.1.5 Sonstiges Verbrauchsmaterial

**Tab. 10: Sonstiges Verbrauchsmaterial**

---

Name	Firma
Falcon Röhrchen	Greiner Bio-One, Solingen
LightCycler <sup>®</sup> Capillaries	Roche, Mannheim
Pipetten, Multipette	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	SARSTEDT, Nümbrecht
SafeLock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturplatten	Thermo Scientific, Karlsruhe SARSTEDT, Nümbrecht
Zymo-Spin <sup>™</sup> Columns III-C + Collection Tubes	ZYMO Research, Freiburg

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Buffy Coat: Isolation von PBMC

Als Basismaterial zur Gewinnung von PBMC („peripheral blood mononuclear cells“) dienten Buffy-Coats, die als Nebenprodukt aus Vollblutspenden hervorgehen. Sie enthalten nach Entzug eines Großteils der Erythrozytenfraktion und des Plasmas Leukozyten und Thrombozyten.

PBMC sind die mononukleären Zellen des Blutes, vor allem B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten. Sie zählen neben den Granulozyten zu den Leukozyten.

Die Isolierung der PBMC erfolgte per Dichtegradientenzentrifugation über dem Zellseparationsmedium Ficoll ( $d=1.077\text{g/ml}$ ).

Um die PBMC zu isolieren, wurde zunächst das heparinisierte Blut aus dem Buffy-Coat mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. Auf das Ficoll wurde dann das Blut-PBS-Gemisch im Verhältnis 3:1 überschichtet. Nach 40-minütiger Zentrifugation (400 g, 20 °C, Bremse 0) reichert sich die PBMC zwischen Plasma und dem Sediment aus Erythrozyten und Granulozyten als Interphasering an. Dieser wurde dann mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen, in 10 ml PBS überführt und in einem ersten Waschschrift erneut zentrifugiert (15 Min., 150 g, 4°C, Bremse 3). Der Überstand wurde abpipettiert, wobei ein wenig Restflüssigkeit im Falcon-Röhrchen verblieb und das Zellpellet wurde darin resuspendiert. Das Falcon-Röhrchen wurde dann erneut bis auf 40 ml mit PBS aufgefüllt und zur Thrombozytenelimination für 15 Min. (150 g, 4 °C, Bremse 3) zentrifugiert. Dieser Schritt erfolgte zwei Mal.

Nach dem letzten Waschgang wurde die gewünschte Population mononukleärer Zellen in 10 ml IAB aufgenommen. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte die Stimulation der PBMC bei einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/well.

### 2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Neubaur-Zählkammer wurden 10 µl Zellgemisch mit 190 µl Türk'scher Lösung (Verdünnung 1:20) angesetzt, wovon 1 Tropfen auf das Zählfeld gegeben wurde. Nach Auszählung von 4 großen Eckquadraten und Bildung des Mittelwertes wurde die gezählte Zellzahl unter Berücksichtigung der vorher verwendeten Verdünnungen und des Kammerfestfaktors ( $10^4$ ) bestimmt.

### 2.2.3 MACS<sup>®</sup> Isolation: T-Zellen CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>

Um aus den PBMC die gewünschten CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu gewinnen, wurden die Zellen magnetisch sortiert (MACS<sup>®</sup> = „magnetic-activated cell sorting“, Firma Miltenyi). Die Selektion der CD4<sup>+</sup>-Zellen erfolgte „negativ“. Alle „Nicht-CD4<sup>+</sup>-Zellen“ (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen,  $\gamma/\delta$ -T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten) wurden primär mit einem Cocktail von Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern (anti-CD8, -CD14, -CD16, -CD19, -CD36, -CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$ , Glycophorin A) direkt markiert und im zweiten Schritt an magnetische Kügelchen („Microbeads“) konjugiert, d.h. die markierten Zellen wurden indirekt durch die Bindung eines zweiten Antikörpers magnetisch beladen. Die Sortierung verlief dann durch eine magnetische Säule, integriert in ein magnetisches Feld, die alle Zellen außer unmarkierten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten depletierte. Man erhielt die reine CD4<sup>+</sup>-Fraktion.

Bei der folgenden Positivselektion wurden die präselektierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen direkt mit CD45RO<sup>+</sup>-Microbeads markiert und in der Säule magnetisch fixiert. Die Gewinnung der Zellfraktion erfolgte per Kolben, der durch die Säule gedrückt wurde und so die magnetischen CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Zellen löste. Alle „nicht-CD45RO<sup>+</sup>-Zellen“ wurden vorher mit dem Strom aus Pufferlösung ausgewaschen.

### 2.2.4 Polarisierung Th17-Zellen

CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/well ausgesät und in 1 ml IAB über 14 Tage mit anti-CD3 (450 ng/ml), anti-CD28 (200 ng/ml) Antikörpern zur Aktivierung stimuliert. Durch Zugabe von IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und IL-23 (50 ng/ml) erfolgte die Polarisierung in Richtung Th17. Die Zellen erhielten alle 2-3 Tage frische Zytokine.

### 2.2.5 Primärzellkultur: Vorhautkeratinozyten

Die Isolation humaner epidermaler Keratinozyten erfolgte aus juveniler Spendervorhaut, die anonymisiert freundlicherweise vom Medizinischen Versorgungszentrum in der Georgstr. 46, 30159 Hannover, zur Verfügung gestellt wurde. Die Hautstücke von ungefähr 1x1 cm Größe wurden in kleinere Stücke geschnitten und über Nacht in Dispase bei 4 °C inkubiert. Die Hautproben wurden dann auf RT erwärmt, die Epidermis mit einer Pinzette abgelöst und in Hanks-Lösung überführt. Im nächsten

Schritt wurde die Epidermis dann in 5 ml Trypsin überführt und im Wasserbad bei 37 °C für 5 Min. inkubiert sowie gevortext. Nach Zugabe von 5 ml Trypsininhibitor wurde die Zellsuspension über einen Zellfilter („cell strainer“) gegeben (40 µm) und mit Hilfe einer Pipette durch das Sieb gedrückt, mit PBS nachgespült und somit die Keratinozyten isoliert.

Dann wurden die Zellen zentrifugiert (1300 g, 20 °C, 3 Min.) und nochmals mit PBS gewaschen.

Die Keratinozyten konnten nun in eine T75-Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) in 20 ml Vollmedium überführt und für ca. 3 Tage kultiviert (Brutschrank 37 °C) werden. Bei einer Konfluenz von noch unter 100% erfolgte das Ablösen und Splitten der Zellen zunächst mit 5 ml EDTA 0,02% (37 °C, 3-5 Min.), danach mit 5 ml Trypsin (37 °C, 5 Min.) und die abschließende Zellzählung.

Entweder konnten die Keratinozyten nun bei -80 °C eingefroren werden oder es erfolgte die Vorbereitung zur Zellkultur (s.u.).

### **2.2.6 Keratinozyten Zellkultivierung: Zellkulturvorbereitung**

Für die Stimulation mussten die Keratinozyten einen bestimmten Konfluenz- und Proliferationsgrad besitzen. Die Keratinozyten wurden aufgetaut, in eine T75-Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) bis zu einer Konfluenz von 70-80% in Vollmedium kultiviert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Passagierung, um Melanozyten zu extrahieren. Hierzu wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml EDTA (3-5 Min., 37 °C) und 5 ml Trypsin (5 Min., 37 °C) lösten sich die adhären Zellen von der Flasche und konnten in einem Falcon-Röhrchen zentrifugiert werden (1300 g, 20 °C, 5 Min.). Die Keratinozyten wurden nun in Vollmedium resuspendiert und konnten mit einer Dichte von 5-6 x 10<sup>4</sup>/ml Vollmedium in Zellkulturplatten ausgesät werden.

Nach 1-2 Tagen Kultivierung bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank erreichten die Keratinozyten einen Konfluenzgrad von ca. 80% und konnten für die Stimulation weiterverwendet werden. Diese erfolgte dann aber in einem Medium ohne Hydrocortison und hEGF.

### 2.2.7 Durchflusszytometrie

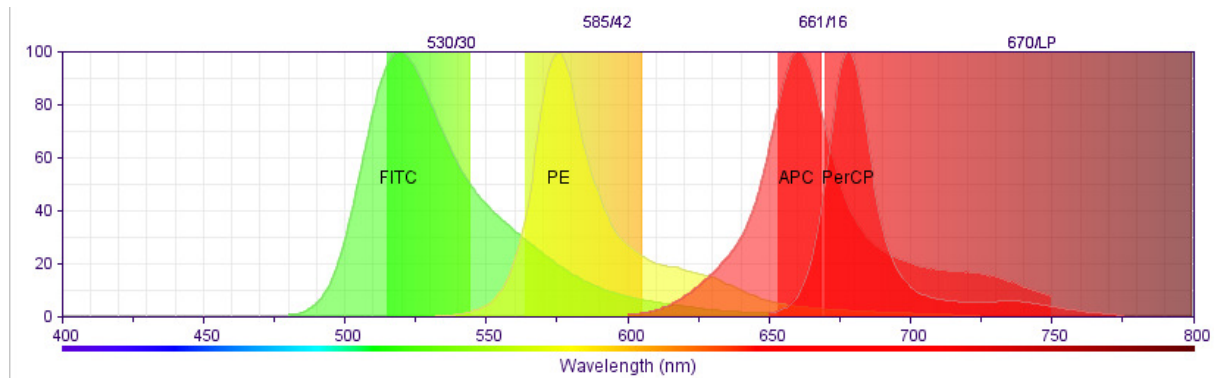
Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode dar, um einerseits Zellzahl und Granularität und andererseits auch die Antigenexpression auf der Zelloberfläche zu bestimmen. Das Durchflusszytometer besteht aus drei Komponenten, die für die Messung erforderlich sind, dem Flüssigkeitssystem, der Optik (bestehend aus Laser, Sammellinse, Spiegel, Filter und Detektoren) und der Elektronik.

Um die Zelleigenschaften erfassen zu können, muss die Zellsuspension zunächst hydrodynamisch fokussiert werden, d.h. es entsteht ein Probenstrom, der die Zellen einzeln hintereinander aufreihet, so dass jede Zelle separat im Analysenpunkt ausgewertet werden kann. Dies geschieht durch einen Laserstrahl, der abhängig von den Eigenschaften der Zelle, nach vorn (FSC = „forward scatter“) und zur Seite (SSC = „sideward scatter“) gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht eine Aussage über die Granularität erlaubt.

Die Analyse von Oberflächenmarkern erfolgt über Fluoreszenz-markierte Antikörper, die an das Epitop binden. Photodetektoren erfassen dann durch den Laser angeregte und emittierte Lichtsignale, die von den gebundenen Antikörpern ausgehen. Das Durchflusszytometer „FACSCalibur™“ kann gleichzeitig vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe erfassen, die von zwei verschiedenen Lasern (blauer Argonlaser (488 nm) und roter Helium-Neon Laser (633 nm)) angeregt werden:

**Tab. 11: Emissionswellenlänge der Fluoreszenzfarbstoffe**

Lasere	Fluoreszenzfarbstoff	Emissionswellenlänge
488 nm	FL-1: FITC Fluoresceinisothiocyanat	525 nm (grünes Spektrum)
	FL-2: PE Phycoerythrin	575 nm (oranges Spektrum)
	FL-3: PerCP Chlorophyll Protein Complex	675 nm (lila Spektrum)
633 nm	FL-4: APC Allophycodyanin	660 nm (rotes Spektrum)



**Abb. 2: Emissionsspektrum FACSCalibur™**

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung von BD Biosciences, New Jersey, USA:  
URL: [https://www.bdbiosciences.com/br/research/multicolor/spectrum\\_viewer/index.jsp](https://www.bdbiosciences.com/br/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp), heruntergeladen am 26.07.2010

Nach Umwandlung der optischen in elektronische Signale wurde die Intensität der einzelnen Fluoreszenzen in einem bilogarithmischen Graphen als Dot Plot Graphik dargestellt und analysiert. Die Daten wurden von der Software CellQuest Pro (BD Biosciences) ausgewertet.

Adhärente Keratinozyten mussten zunächst mit EDTA (5 Min., 37 °C) und HyQTase (10 Min., 37 °C) von der Zellwand gelöst werden, während PBMC direkt verwendet werden konnten.

Die Antikörper-Markierung der Zellen erfolgte in 100 µl Blockpuffer für 60 Min. nach vorheriger Inkubation mit Blockpuffer für 10 Min. bei 4 °C, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach Abzentrifugation (1300 g, 4 °C, 3 Min.) und 3-facher Waschung der Zellen mit 200 µl Waschpuffer erfolgte die Messung der Zellen am FACSCalibur™.

Die T-Lymphozyten, die intrazellulär angefärbt wurden, erhielten nach Herstellerprotokoll 5h vor der Messung eine Stimulation mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml). Weiterhin verhinderte die Zugabe von Monensin (3 µM) das Ausschleusen der zu messenden Zytokine, die dann intrazellulär mit Antikörpern markiert und gemessen werden konnten.

### 2.2.8 ELISA

Das Prinzip des ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“) beruht auf der Erkennung von z. B. Peptiden und Proteinen durch spezifische Antikörper nach dem Sandwich-Prinzip, d.h. der zu detektierende Analyt wird durch zwei Antikörper gebunden.

Der erste Antikörper („capture antibody“) wurde über Nacht auf einer 96-well-Platte inkubiert und somit an die Oberfläche fixiert. Freie Antikörper wurden durch viermaliges Waschen entfernt. Um noch freie Bindungsstellen zu blockieren, erfolgte die Zugabe von Blockpuffer für eine Stunde. Nach erneutem Waschen wurden die Standardverdünnungsreihe sowie die Proben hinzugefügt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler inkubiert. Nach abermaligem Waschen erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers („detection antibody“) sowie des Enzyms Streptavidin, das im letzten Schritt ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umsetzte. Die Zugabe von Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) stoppte die Farbreaktion. Die Höhe des Absorptionsgrades korreliert proportional mit der Konzentration an Analyten (Lambert-Beer'sches-Gesetz) und kann unter Abgleich mit der Standardverdünnungsreihe photometrisch bei 405 nm quantifiziert werden (FLUOStar OPTIMA).

### 2.2.9 RNA-Isolation und cDNA-Präparation

Um die RNA aus PBMC bzw. Keratinozyten zu gewinnen, wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l ZR RNA Buffer (Firma ZYMO Research) lysiert. Der Puffer destruierte zum einen die Zellwand und stabilisierte auf der anderen Seite die RNA, die dann in einem nächsten Schritt mit Hilfe von Säulen mit integriertem Filter („Zymo-Spin Columns“) und Sammelröhrchen („Collection Tubes“) in einem zweifachen Waschschrift („RNA Wash Buffer“) aufgereinigt wurde. Im finalen Schritt folgte die Elution aus dem Filter mit 50  $\mu$ l DNase-/RNase-freiem Wasser. Weiterhin wurde ein Spektrophotometer (NanoDROP™ 2000) verwendet, um die RNA-Menge zu bestimmen und letztlich von jeder Probe die gleiche RNA-Konzentration für die cDNA-Synthese einzusetzen.

Für die Synthese einzelsträngiger cDNA musste die RNA zunächst mit Hilfe von reverser Transkriptase (rT) umgeschrieben werden. Dazu wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas verwendet. Der Mastermix-Ansatz enthielt neben der rT (M-MuLV-rT) auch Puffer (5x Buffer), Nukleotidtriphosphate (dNTP), RNase Inhibitor (RiboLock™) und Oligo-Primer (oligo(dT)<sub>18</sub> primer). Neben der Pro-

ben-RNA, die mit Hilfe des Mastermixes umgeschrieben wurde, gab es auch eine Negativkontrolle ohne rT, um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

### Real-Time RT-PCR:

**Tab. 12: Verwendete Primer in der PCR**

Primername	Primersequenz/-nr.	Amplicon length	Spezifität
GAPDH	QT01192646	119 bp	GAPDH RT-PCR
FLG 2	QT01665153	125 bp	Filaggrin RT-PCR
IL20	QT00044905	134 bp	Interleukin 20 RT-PCR
HBD2for1	5' - gCCTCTTCCAaggTgTTTTTg	118 bp	HBD-2 RT-PCR
hBD2ra	5' - gAgACCACAaggTgCCAATTT	118 bp	HBD-2 RT-PCR

1 µl der cDNA diente als Matrize für die PCR. Dazu kamen 10 µl SYBR Green I, 7 µl DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O und 2 µl Primer. Neben den zu messenden Proben wurde eine DNA-freie Kontrolle mitgeführt, um die Reinheit zu bestätigen.

Die Reaktionsmischung wurde in einem initialen Schritt für 15 Min. auf 95 °C erhitzt, daraufhin wurde 45-mal folgender Zyklus gefahren:

- 15 Sek. bei 94 °C: Denaturierung („denaturation“)
- 20 Sek. bei 55 °C: Anlagerung der Primer („annealing“)
- 20 Sek. bei 72 °C: Polymerisation und Synthese der komplementären DNA („extension“)

Das Verfahren der „real time“ RT-PCR beruht auf der Amplifikation von cDNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der gleichzeitigen Erfassung der entstandenen Produktmenge per Fluoreszenz-Messung.

Dies ist möglich, da der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green 1) in die vervielfältigte doppelsträngige DNA interkaliert und somit die Fluoreszenzintensität mit jedem Zyklus ansteigt. Die Messung erfolgte nach jeder Annealingphase.

Um die Spezifität zu erhöhen, wurde nach der Amplifikation eine Schmelzkurve erstellt. Sie ermöglichte die Unterscheidung zwischen unspezifisch entstandenen Primerdimeren und dem spezifischen PCR-Produkt. Die DNA wurde dazu auf 65 °C ( $20 \text{ °C s}^{-1}$ ) abgekühlt, um danach auf eine Temperatur von 95 °C ( $0,2 \text{ °C s}^{-1}$ ) erhitzt zu werden. Das Erhitzen bewirkte eine Denaturierung des DNA-Doppelstranges, wobei SYBR Green I freigesetzt wurde, was zu einer Fluoreszenzabnahme führte. Da der Schmelzpunkt für das spezifische Produkt höher lag, als der von Primerdimeren, konnte dies als Unterscheidungsmerkmal herangezogen werden.

### **2.2.10 Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte zunächst mittels Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung. Da für alle Experimente in dieser Dissertation die Anzahl gepaarter Stichproben  $\geq 3$  war, wurden in der Folge normal verteilte Stichproben über den Repeated Measures ANOVA sowie Bonferroni Post-Test auf Signifikanz getestet. Nicht normal verteilte Stichproben wurden analog nach vorheriger Testung auf Normalverteilung über den Friedman-Test sowie Dunn's Post-Test auf Signifikanz geprüft.

Ein p-Wert kleiner als 0,05 (Abweichung von der Nullhypothese ist geringer als 5%) wurde als statistisch signifikant erachtet (\*). Ein p-Wert  $<0,01$  ist mit zwei \*\*, ein Wert  $<0,001$  mit drei \*\*\* gekennzeichnet. Die Berechnungen sowie alle graphischen Darstellungen erfolgten mit der Software GraphPad Prism 5.

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Untersuchung des Effekts von Ciclosporin A auf die Funktion von PBMC**

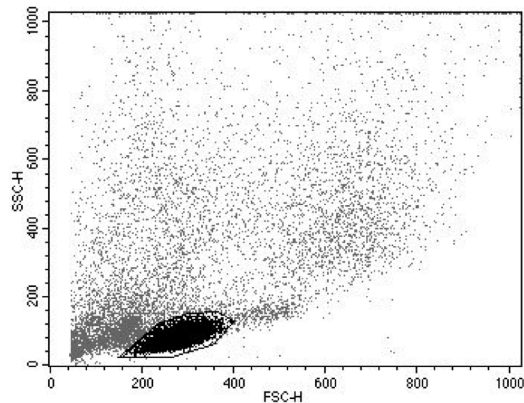
##### **3.1.1 Analyse von Haut-spezifischen T-Zellen**

T-Lymphozyten im Blut, die das Adhäsionsmolekül CLA auf ihrer Oberfläche exprimieren, migrieren spezifisch in die Haut.<sup>22</sup> Der Chemokinrezeptor CCR6 spielt ebenfalls eine Rolle im Entzündungsstadium der Haut und wird u.a. auf CLA<sup>+</sup>-T-Zellen exprimiert.<sup>195</sup> Unter diesem Aspekt besteht ein besonderes Interesse an der Analyse dieser Subgruppe von T-Zellen unter der Wirkung von CsA, da sie in entzündlichen Hauterkrankungen wie der AD und Psoriasis eine Rolle spielen.

##### **3.1.1.1 Wirkung von Ciclosporin A auf CLA<sup>+</sup>-T-Zellen**

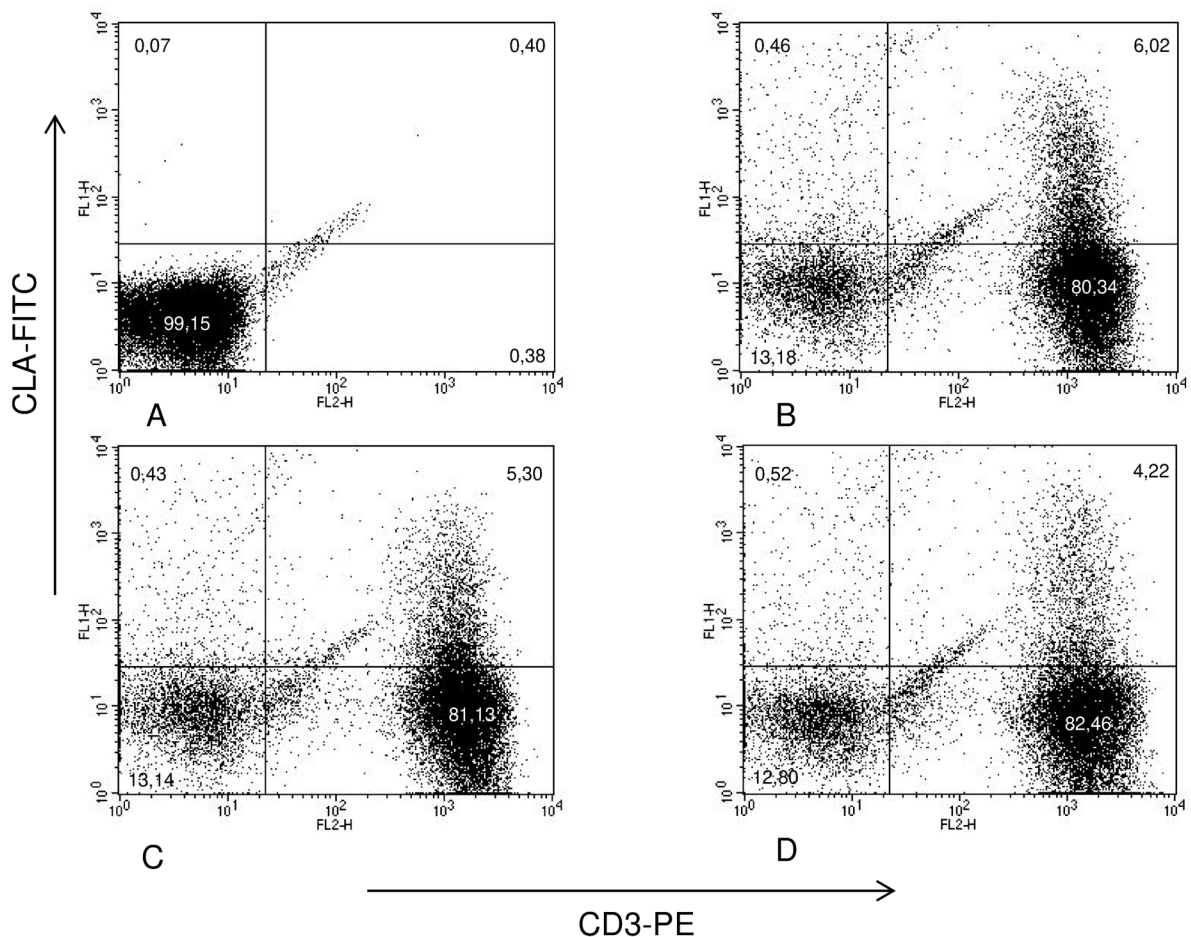
Zunächst wurde in einem Vorversuch mit geringer Stichprobengröße auf PBMC von gesunden Spendern die Expression von CLA unter Einwirkung von CsA untersucht. Dazu wurden die frisch isolierten PBMC für je 48h und 72h mit unterschiedlichen Konzentrationen CsA inkubiert und anschließend mit einem monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CLA gefärbt. Danach wurde die Bindung dieser fluoreszierenden Antikörper an die Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Da die Expression hauptsächlich auf Lymphozyten analysiert werden sollte, wurde mittels Setzen eines „Gates“ ausschließlich diese Zellfraktion selektiert.

Der Einsatz von CsA bewirkte in diesem ersten Vorversuch in aufsteigenden Konzentrationen eine zunehmende Herunterregulation von CLA nach 48- sowie 72-stündiger Inkubation, wobei der Effekt nach 48h ausgeprägter war.



**Abb. 3: Selektion („Gaten“) der Lymphozyten-Fraktion**

Die Fraktion von Lymphozyten wurde durch Setzen eines „Gates“ (schwarz) aus den übrigen PBMC herausgefiltert. Die Expression von CLA wurde nur auf diesen Zellen untersucht.



**Abb. 4: Durchflusszytometrische Analyse von CD3<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nach Inkubation mit Ciclosporin A**

Exemplarische Darstellung von PBMC, die mit CD3 (PE) und CLA (FITC) doppegefärbt und im Durchflusszytometer untersucht wurden. A: Negativkontrolle; Inkubation mit CsA in den Konzentrationen B: 25 ng/ml C: 50 ng/ml und D: 100 ng/ml für 48h. Bei steigenden Konzentrationen von CsA wird eine leichte Abnahme der CD3<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erkennbar.

**Tab. 13: CD3<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nach Inkubation mit Ciclosporin A**

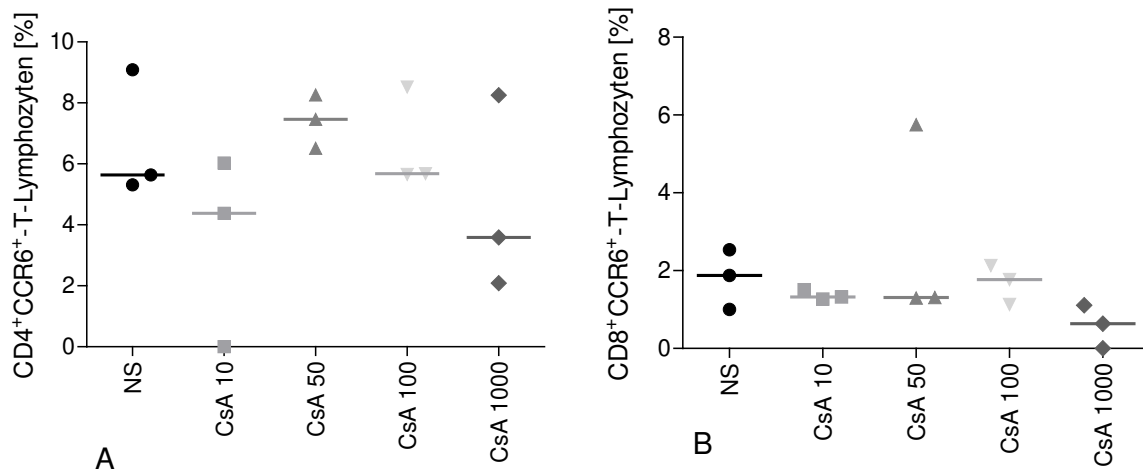
CD3 <sup>+</sup> CLA <sup>+</sup> -Zellen [%]	CsA 25	CsA 50	CsA 100
48h	12,65	10,71	8,70
	5,62	4,87	4,04
72h	8,35	7,47	5,89

Tabellarische Darstellung der Expression von CLA auf T-Lymphozyten nach 48- (n=2) und 72-stündiger (n=1) Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen CsA (25, 50, 100 ng/ml).

### 3.1.1.2 Wirkung von Ciclosporin A auf CCR6<sup>+</sup>-T-Zellen

Ein weiterer Oberflächenrezeptor, der untersucht wurde, war CCR6. Dazu wurden die PBMC mit vier unterschiedlichen Konzentrationen CsA für 48h inkubiert (10, 50, 100, 1000 ng/ml) und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CCR6 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Zur weiteren Differenzierung der T-Lymphozyten wurde die Wirkung von CsA auf den Rezeptor CCR6 bei T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) (Abb. 5A) und zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) (Abb. 5B) separat untersucht.

In unserer Versuchsreihe konnten wir die Expression von CCR6 auf CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten dreimal so hoch wie auf CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten messen. Insgesamt kam es bei Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen CsA nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration zu einer mäßigen Verringerung des Anteils CCR6<sup>+</sup>-Zellen bei CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten.



**Abb. 5: Einfluss von Ciclosporin A auf die CCR6-Expression auf T-Lymphozyten**  
 Expression des Rezeptors CCR6 auf T-Lymphozyten nach 48-stündiger Inkubation mit CsA in verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100, 1000 ng/ml). CD4<sup>+</sup>- (Abb. 5A) und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Abb. 5B) wurden separat dargestellt. Die Messung des Rezeptors auf der Zelloberfläche erfolgte nach Immunfluoreszenzfärbung im Durchflusszytometer (n=3, Einzelwerte, Median).

### 3.1.2 Wirkung von Ciclosporin A auf die Expression von IL-17, IL-22 und IL-23R

Um den Einfluss von CsA auf die Expression von IL-17, IL-22 und IL-23R in bzw. auf T-Lymphozyten zu bestimmen, wurden PBMC für 48h mit 100 ng/ml SEB stimuliert, wobei eine Inkubation mit 50 ng/ml CsA für 1h vorausging. Anschließend wurden die Zellen für die durchflusszytometrische Messung präpariert und IL-17 und IL-22 intrazellulär, sowie CD3 zur Markierung von T-Lymphozyten und IL-23R auf der Oberfläche gemessen. Der IL-23R wurde in die Untersuchung aufgenommen, da IL-23 an der Entwicklung von Th17-Zellen beteiligt ist.<sup>54 196</sup> Diese können unter proinflammatorischen Bedingungen IL-17 wie auch IL-22 sezernieren.<sup>16</sup>

Zunächst konnte bestätigt werden, dass SEB als Induktor für IL-22 in T-Zellen wirkt, wie bereits zuvor von Niebuhr et al. in der Arbeitsgruppe in Hannover gezeigt wurde.<sup>102</sup> (Abb. 6B)

CsA regulierte IL-17 in unstimulierten und in SEB-stimulierten T-Zellen tendenziell herunter (Abb. 6A), während es unter gleichen Bedingungen keinen eindeutigen Effekt auf IL-22 und einen leicht heraufregulierenden Effekt auf den IL-23R hatte (Abb. 6B und C).



Th17-Zellen wurden erstmals im Jahr 2005 beschrieben.<sup>54</sup> Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von zahlreichen Autoimmunerkrankungen und sind u.a. durch die Membranmoleküle CD4 und IL-23R sowie die Produktion von IL-17 und IL-22 gekennzeichnet.<sup>128</sup>

### **3.2.1 Reinheitskontrolle der verwendeten CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-T-Lymphozyten**

Zunächst wurden CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus PBMC mittels Negativselektion mit magnetisch beladenen Antikörpern herausgefiltert. Anschließend erfolgte daraus die Isolation von CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen.

Die Reinheit der CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurde am Durchflusszytometer durch Kontrollfärbungen des Membranmoleküls CD4 gegen CD8 sowie gegen CD45RO überprüft.

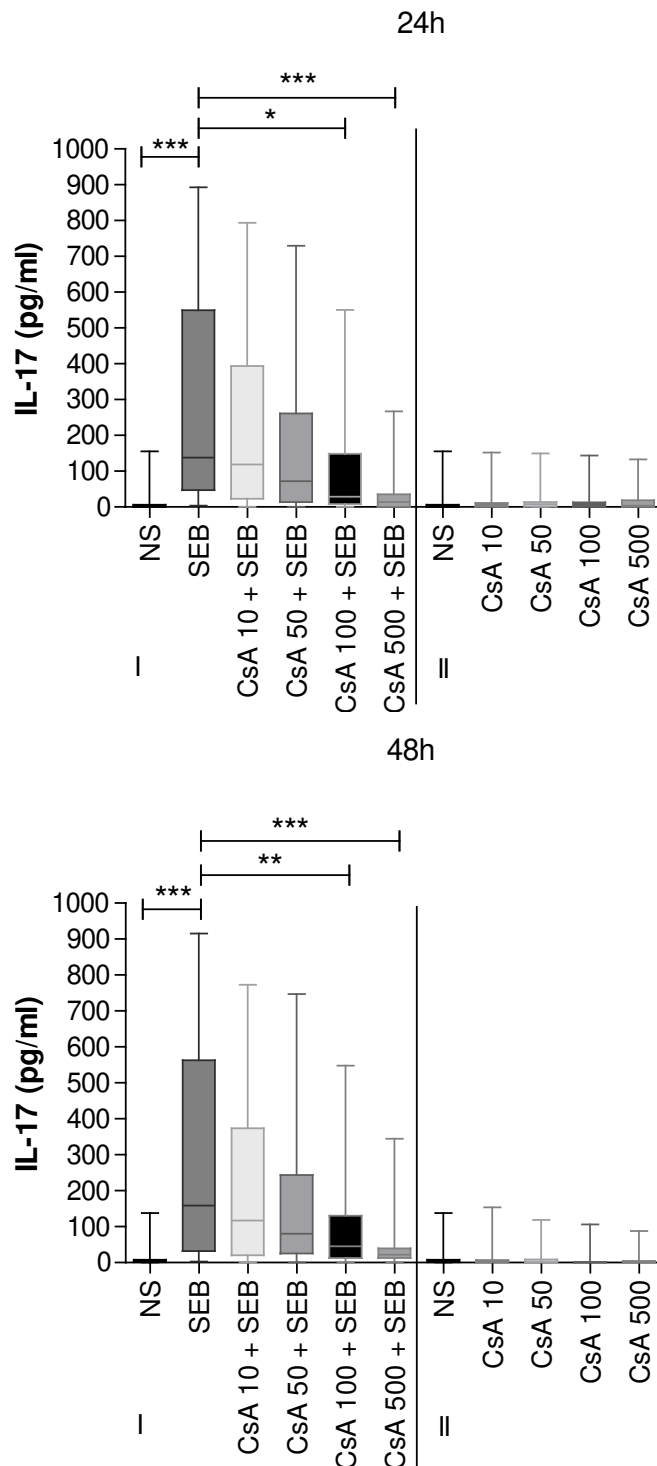
Es konnte eine Reinheit der Memory-T-Zellen von 85% erreicht werden, die dann über 14 Tage polarisiert wurden.

### **3.2.2 Einfluss von Ciclosporin A auf IL-17 und IL-22**

Aus PBMC wurden CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-T-Lymphozyten isoliert und – wie unter 2.2.4. Material & Methoden beschrieben – mit anti-CD3, anti-CD28, IL-1 $\beta$ , sowie IL-23 zu Th17-Zellen polarisiert. Diese wurden dann nach vorhergehender Inkubation mit CsA (10, 50, 100, 500 ng/ml) für 4h für jeweils 24h und 48h mit SEB (100 ng/ml) stimuliert. Die Bestimmung der Zytokinproduktion aus dem Überstand erfolgte mittels ELISA.

Während unstimulierte Th17-Zellen sowie nach Inkubation mit CsA alleine kaum IL-17 produzierten, bewirkte SEB einen hochsignifikanten Anstieg von IL-17 nach 24h sowie nach 48h. In SEB behandelten Th17-Zellen führte CsA dosisabhängig zu einer teils signifikanten Senkung der durch SEB induzierten IL-17-Sekretion (Abb. 7).

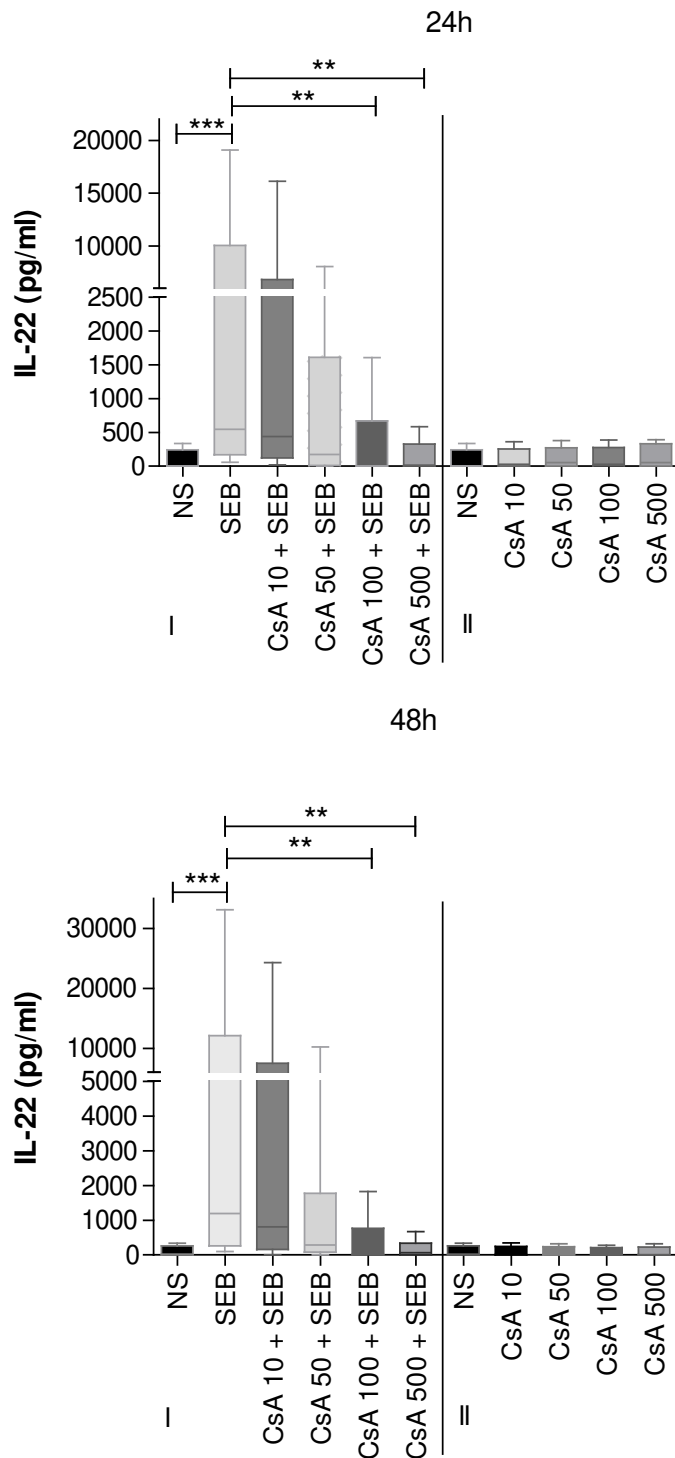
Th17-Zellen sezernierten unter SEB-Stimulation hochsignifikant auch das Zytokin IL-22, nach 48h im Median sogar doppelt so viel wie nach 24-stündiger Inkubation. Im nicht-stimulierten Zustand sowie nach CsA-Inkubation war eine vergleichbar geringe Menge IL-22 im Überstand messbar. Die durch SEB induzierte Sekretion von IL-22 wurde – noch stärker als die von IL-17 – in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise durch CsA teilweise signifikant herunterreguliert (Abb. 8).



**Abb. 7: Einfluss von Ciclosporin A auf die SEB induzierte Sekretion von IL-17 von polarisierten Th17-Zellen**

I: Stimulationsansatz mit SEB II: Kontrollansatz ohne SEB

Th17-Zellen wurden für 4h mit CsA in verschiedenen Konzentrationen inkubiert (10, 50, 100, 500 ng/ml). Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit SEB (100 ng/ml) für jeweils 24 und 48h. Die Zytokinfreisetzung von IL-17 in den Zellkultur-Überstand wurde mittels ELISA gemessen (n=8, Median, 50%). Die statistische Signifikanz wurde für die Gruppen I und II jeweils getrennt nach Testung auf Normalverteilung mittels Friedman-Test (ANOVA) und Dunn's Post-Test bestimmt.



**Abb. 8: Einfluss von Ciclosporin A auf die SEB induzierte Sekretion von IL-22 von polarisierten Th17-Zellen**

I: Stimulationsansatz mit SEB II: Kontrollansatz ohne SEB

Th17-Zellen wurden nach vorheriger vierstündiger CsA-Inkubation (10, 50, 100, 500 ng/ml) mit SEB für je 24h und 48h stimuliert. Die Zytokinfreisetzung von IL-22 in den Zellkultur-Überstand wurde mittels ELISA gemessen (n=8, Median, 50%). Die statistische Signifikanz wurde für die Gruppen I und II jeweils getrennt nach Testung auf Normalverteilung mittels Friedman-Test (ANOVA) und Dunn's Post-Test bestimmt.

### 3.3 Untersuchung des Effekts von Ciclosporin A auf die Funktion von Keratinozyten

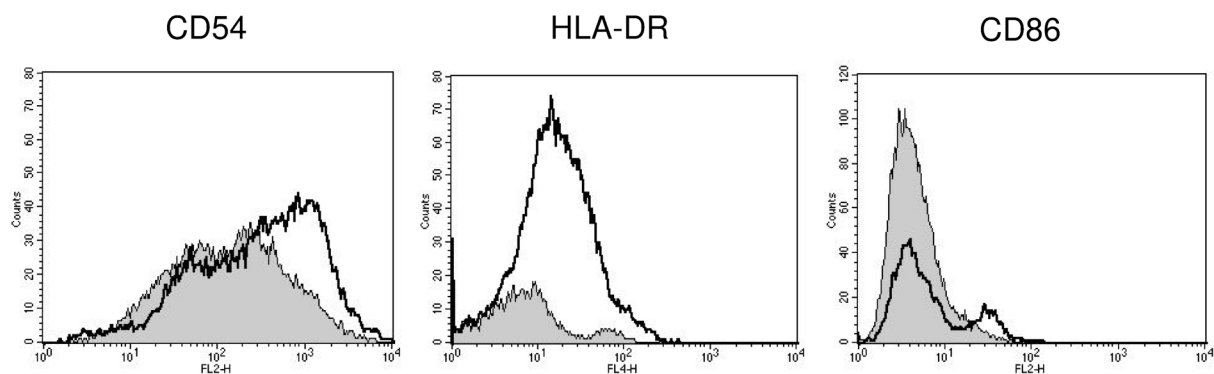
Der Effekt von CsA beschränkt sich nicht auf hämatopoetische Zellen, sondern könnte auch auf Keratinozyten bei der Behandlung von Hautkrankheiten für die therapeutische Wirkung relevant sein.

#### 3.3.1 Durchflusszytometrischer Nachweis der Aktivierung durch IFN- $\gamma$

Um den optimalen Aktivitätszustand der Keratinozyten zu bestimmen, wurden die Zellen dosis-, sowie zeitkinetisch mit IFN- $\gamma$  stimuliert.

Dazu wurden die Keratinozyten mit je 10 ng/ml oder 20 ng/ml IFN- $\gamma$  für 24h und 48h stimuliert und dabei die Regulation der Membranmoleküle CD54, HLA-DR, CD80, CD86 sowie CD154 (CD40L) im Durchflusszytometer untersucht.

Nach Aktivierung mit 20 ng/ml IFN- $\gamma$  waren CD54, HLA-DR und CD86 nach 48h Inkubationszeit am stärksten exprimiert (Abb. 9). Dieser Zeitpunkt und diese IFN- $\gamma$ -Dosis wurden in den nachfolgenden Experimenten übernommen.



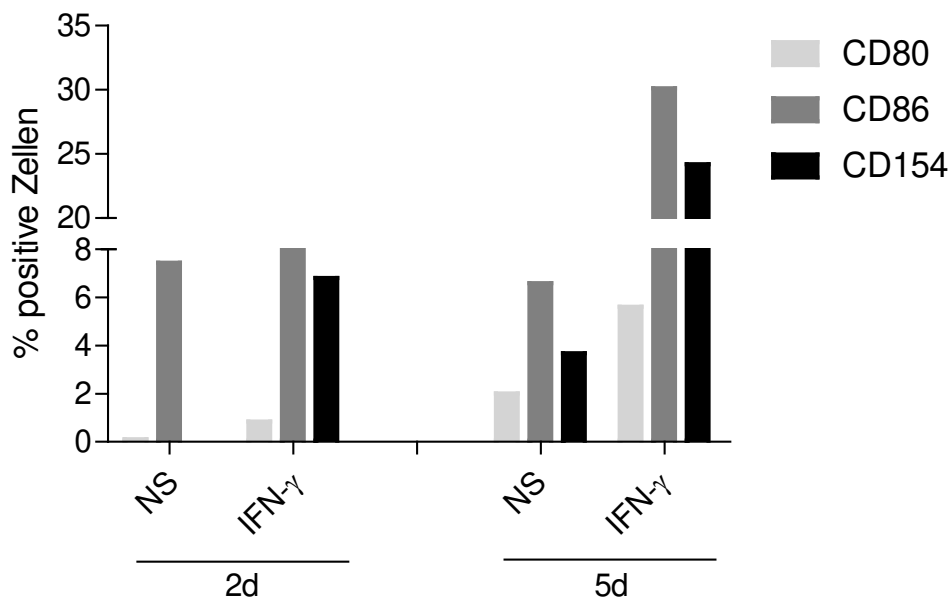
**Abb. 9:** Durchflusszytometrische Darstellung der Expression von Membranmolekülen unter IFN- $\gamma$ -Stimulation auf Keratinozyten

Exemplarisch dargestellt sind die drei Membranmoleküle CD54 (PE), HLA-DR (APC) und CD86 (PE) auf Keratinozyten im Durchflusszytometer. Jeweils abgebildet sind die Expression der Membranmoleküle im nicht-stimulierten Zustand der Zellen (grau), sowie die Expression nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 48h.

Um zu untersuchen, ob durch eine längere Inkubationsdauer als 48h ein noch höherer Aktivierungsgrad erreicht wird, insbesondere im Hinblick auf die Membranmolekü-

le CD80 und CD154, die nicht konstitutiv exprimiert werden, wurden Keratinozyten mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) im Vergleich für 2d und 5d stimuliert.

Nach 5d war eine noch stärkere Hochregulation der Membranmoleküle im Verhältnis zu nicht-stimulierten Zellen sichtbar. Allerdings sahen viele Keratinozyten mikroskopisch zu diesem Zeitpunkt zum Teil nicht mehr vital aus, sodass die Stimulationsdauer von 48h für alle Folgeexperimente gewählt wurde.



**Abb. 10: Expression von Membranmolekülen unter zeitkinetischer IFN- $\gamma$ -Stimulation auf Keratinozyten**

Keratinozyten wurden mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 2d und 5d stimuliert und im Hinblick auf die Expression der Membranmoleküle CD80, CD86 und CD154 im Durchflusszytometer untersucht (Einzelexperiment).

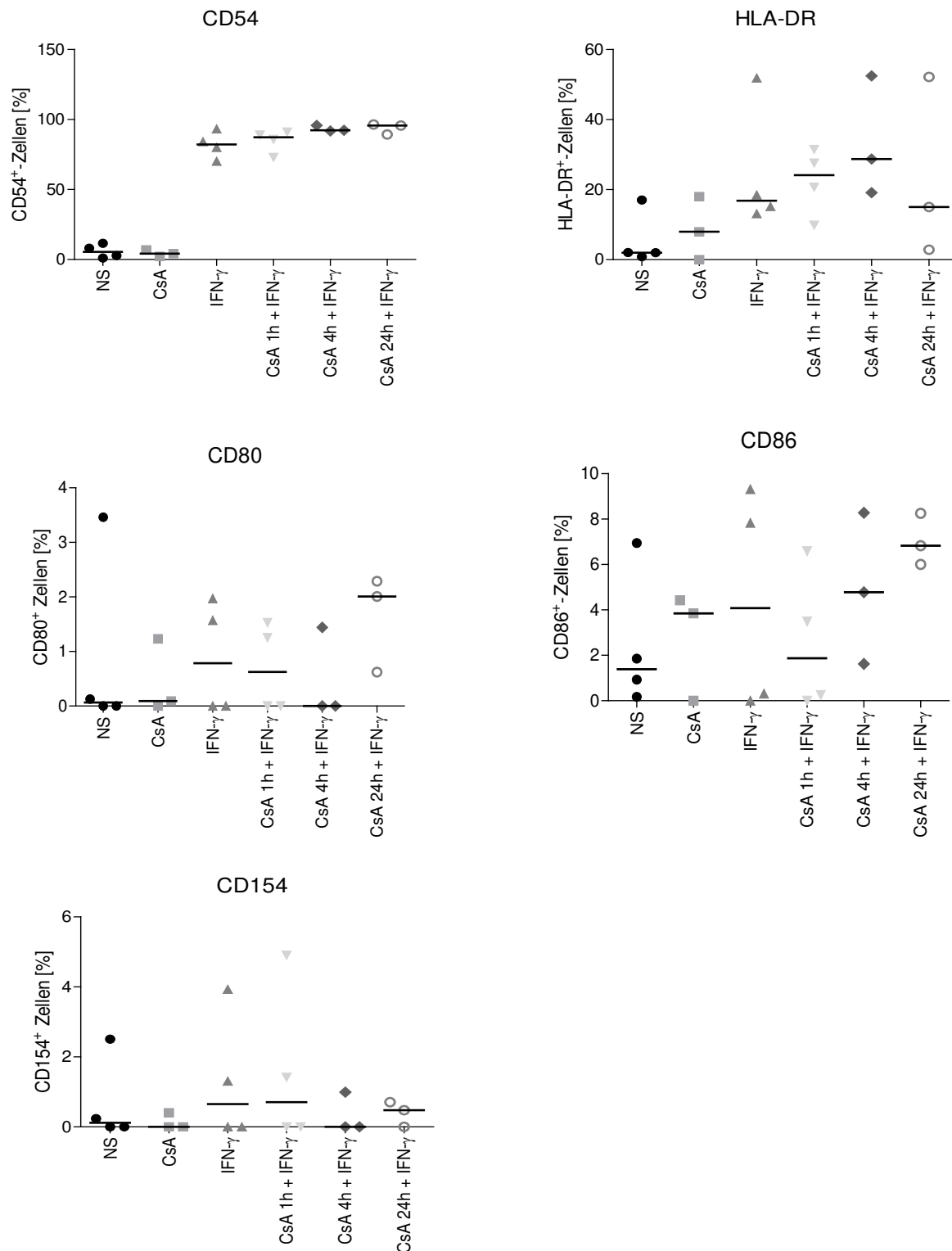
### 3.3.2 Wirkung von Ciclosporin A auf die Expression von Membranmolekülen auf durch IFN- $\gamma$ aktivierte Keratinozyten

Nachdem ein Stimulationszeitraum von 48h für IFN- $\gamma$  optimal schien, wurde die Expression der Membranmoleküle CD54, HLA-DR, CD80, CD86 und CD154 unter dem Einfluss der Behandlung von Keratinozyten mit CsA im Detail untersucht.

Dazu wurden Keratinozyten mit CsA (50 ng/ml) für 1h, 4h sowie 24h vorinkubiert, gefolgt von einer 48-stündigen Stimulation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml). Anschließend wurden die Membranmoleküle auf Keratinozyten durchflusszytometrisch untersucht.

---

Es kam zu keiner deutlichen Regulation der Membranexpression von CD54, HLA-DR, CD80, CD86 oder CD154 nach Inkubation mit CsA in aufsteigender Dauer vor Stimulation mit IFN- $\gamma$  (Abb. 11).



**Abb. 11: Einfluss von Ciclosporin A und IFN- $\gamma$  auf die Expression von Membranmolekülen auf Keratinozyten**

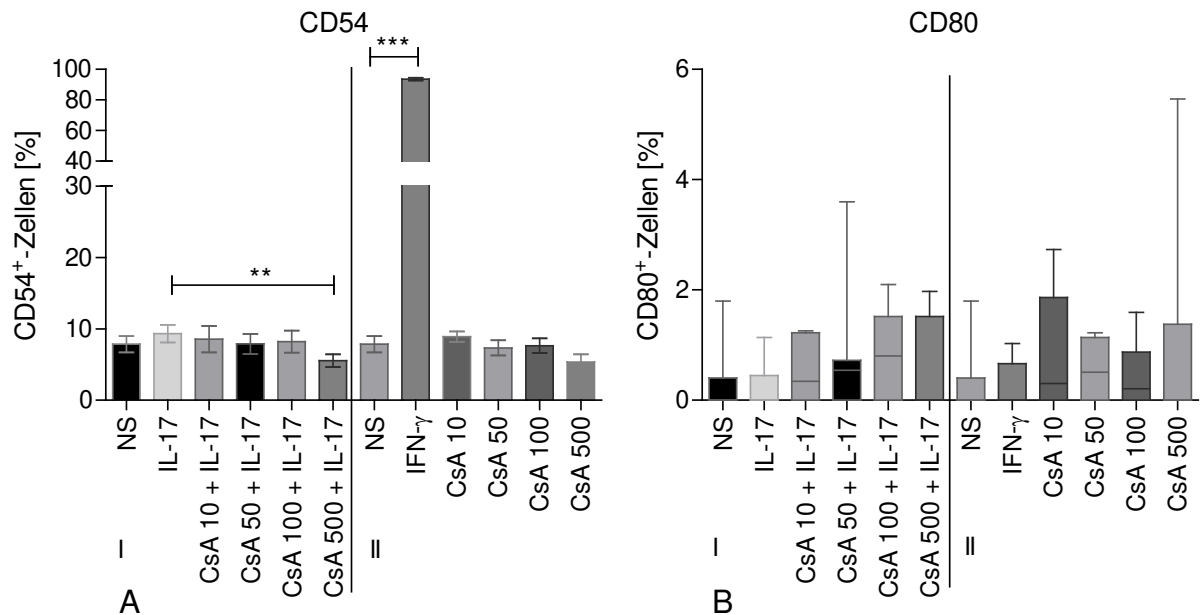
Keratinozyten wurden nach Vorinkubation mit CsA (50 ng/ml) für 1h, 4h, oder 24h mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 48h stimuliert. Die Messung der Membranmoleküle erfolgte im Durchflusszytometer (n=3-4, Einzelwerte, Median).

### **3.3.2.1 Wirkung von Ciclosporin A auf die Expression von CD54 und CD80 auf IL-17 stimulierten Keratinozyten**

Keratinozyten wurden mit IL-17 (10 ng/ml) für 48h stimuliert, nachdem sie vorher mit CsA in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100, 500 ng/ml) für 4h inkubiert worden waren. Danach wurden sie im Durchflusszytometer hinsichtlich Expression der Membranmoleküle CD54 sowie CD80 untersucht.

CD54 wurde durch IFN- $\gamma$  (20 ng/ml), das hier als Positivkontrolle eingesetzt wurde, hochsignifikant heraufreguliert, während IL-17 diesen Effekt nicht induzierte. CsA alleine bewirkte in allen Konzentrationen nur eine gering veränderte Regulation von CD54 oder CD80. Die kombinierte Stimulation mit CsA und IL-17 regulierte CD54 tendenziell dosisabhängig, in höchster Konzentration signifikant, herunter (Abb. 12A).

Das Membranmolekül CD80 war mit weniger als 1% positiver Keratinozyten im Vergleich auf viel geringerem Niveau exprimiert. Durch die verschiedenen Konzentrationen CsA wurde die Expression von CD80 nicht signifikant verändert (Abb. 12B).



**Abb. 12: Einfluss von Ciclosporin A und IL-17 auf die Expression von Membranmolekülen auf Keratinozyten**

I: Stimulationsansatz mit IL-17 II: Kontrollansatz mit CsA

Keratinozyten wurden mit IL-17 (10ng/ml) für 48h stimuliert sowie vorher mit CsA (10, 50, 100, 500ng/ml) 4h inkubiert und im Durchflusszytometer untersucht (CD54: n=7, Mittelwert  $\pm$  SEM; CD80: n=7, Median, 50%).

Die statistische Signifikanz wurde für die Gruppen I und II jeweils getrennt nach Testung auf Normalverteilung mittels Repeated Measures ANOVA und Bonferoni Post-Test (CD54, Normalverteilung) bzw. Friedman-Test (ANOVA) und Dunn's Post-Test bestimmt (CD80, nicht normal verteilte Stichproben).

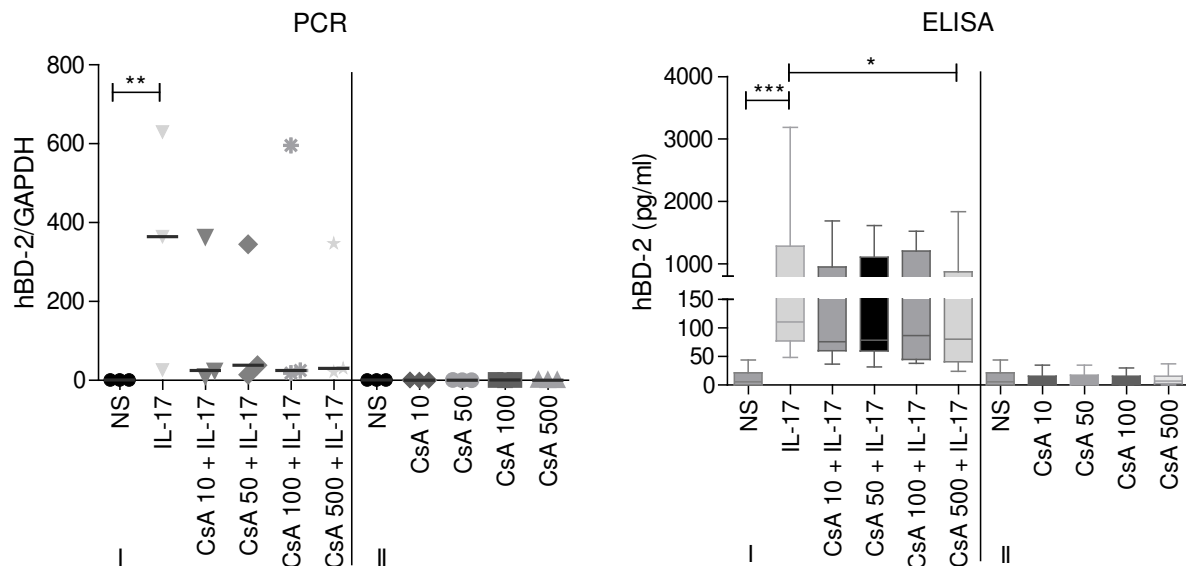
### 3.3.3 Wirkung von Ciclosporin A auf hBD-2 in Keratinozyten

#### 3.3.3.1 Einfluss von Ciclosporin A auf IL-17 induziertes hBD-2 in Keratinozyten

Humane Keratinozyten wurden mit CsA in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100, 500 ng/ml) vorinkubiert und danach mit IL-17 (10 ng/ml) stimuliert. Die Stimulationsdauer mit IL-17 war abhängig von der Untersuchungsmethode. Um den Einfluss auf der mRNA-Ebene zu bestimmen, wurden die Zellen für 24h mit IL-17 stimuliert, während der Nachweis auf Proteinebene (ELISA) nach 48-stündiger Stimulation mit IL-17 erfolgte.

Auf beiden Ebenen konnte die Induktion von hBD-2 in Keratinozyten durch IL-17 signifikant nachgewiesen werden. CsA alleine hatte keinen Effekt auf die hBD-2-Expression in Keratinozyten, während die Vorinkubation mit CsA in allen Konzentra-

tionen die durch IL-17 induzierte hBD-2-Heraufregulation auf Proteinebene verhin- derte. In höchster Konzentration war dieser Effekt statistisch signifikant (Abb. 13).



**Abb. 13: Einfluss von Ciclosporin A auf IL-17 induziertes hBD-2 von Keratinozyten**

I: Stimulationsansatz mit IL-17 II: Kontrollansatz mit CsA

Keratinozyten wurden mit CsA in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100, 500 ng/ml) für 4h vorinkubiert und danach für 24h (PCR) oder 48h (ELISA) mit IL-17 (10 ng/ml) stimuliert. HBD-2 wurde anschließend auf mRNA-Ebene (quantitative real-time RT-PCR, n=3, Einzelwerte, Median) sowie auf Proteinebene (ELISA, n=11, Median, 50%,) bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde für die Gruppen I und II jeweils getrennt nach Testung auf Normalverteilung mittels Friedman-Test (ANOVA) und Dunn's Post-Test bestimmt.

### 3.3.3.2 Einfluss von Ciclosporin A auf IL-22 induziertes hBD-2 in Keratinozyten

Keratinozyten wurden mit sieben verschiedenen Konzentrationen CsA (1, 2.5, 5, 10, 50, 100, 500 ng/ml) vorinkubiert, gefolgt von einer Stimulation mit IL-22 (50 ng/ml).

Um die Regulation von hBD-2 auf mRNA-Ebene zu bestimmen, wurden Keratinozyten mit CsA 1h vorinkubiert und nachfolgend mit IL-22 für je 4h, 8h, 12h, 16h und 24h stimuliert. Es zeigte sich, dass IL-22 - anders als IL-17 - die hBD-2 Transkription unter den meisten Bedingungen nicht induzierte und dass auch CsA in Kombination mit IL-22 keinen signifikanten Effekt auf die hBD-2-Expression hatte (Abb. 14).

Des Weiteren wurde die hBD-2-Sekretion auf der Proteinebene bestimmt. Hier wurden Keratinozyten mit CsA 4h vorinkubiert und anschließend für je 48h und 72h mit IL-22 stimuliert.

Nach 72-stündiger Inkubationsdauer konnte – überraschenderweise – eine erhöhte Sekretion von hBD-2 durch CsA in IL-22 stimulierten Keratinozyten beobachtet werden. Hier fiel auf, dass insbesondere niedrige Konzentrationen CsA (1, 2.5, 5 ng/ml) hBD-2 signifikant heraufregulierten (Abb. 15).

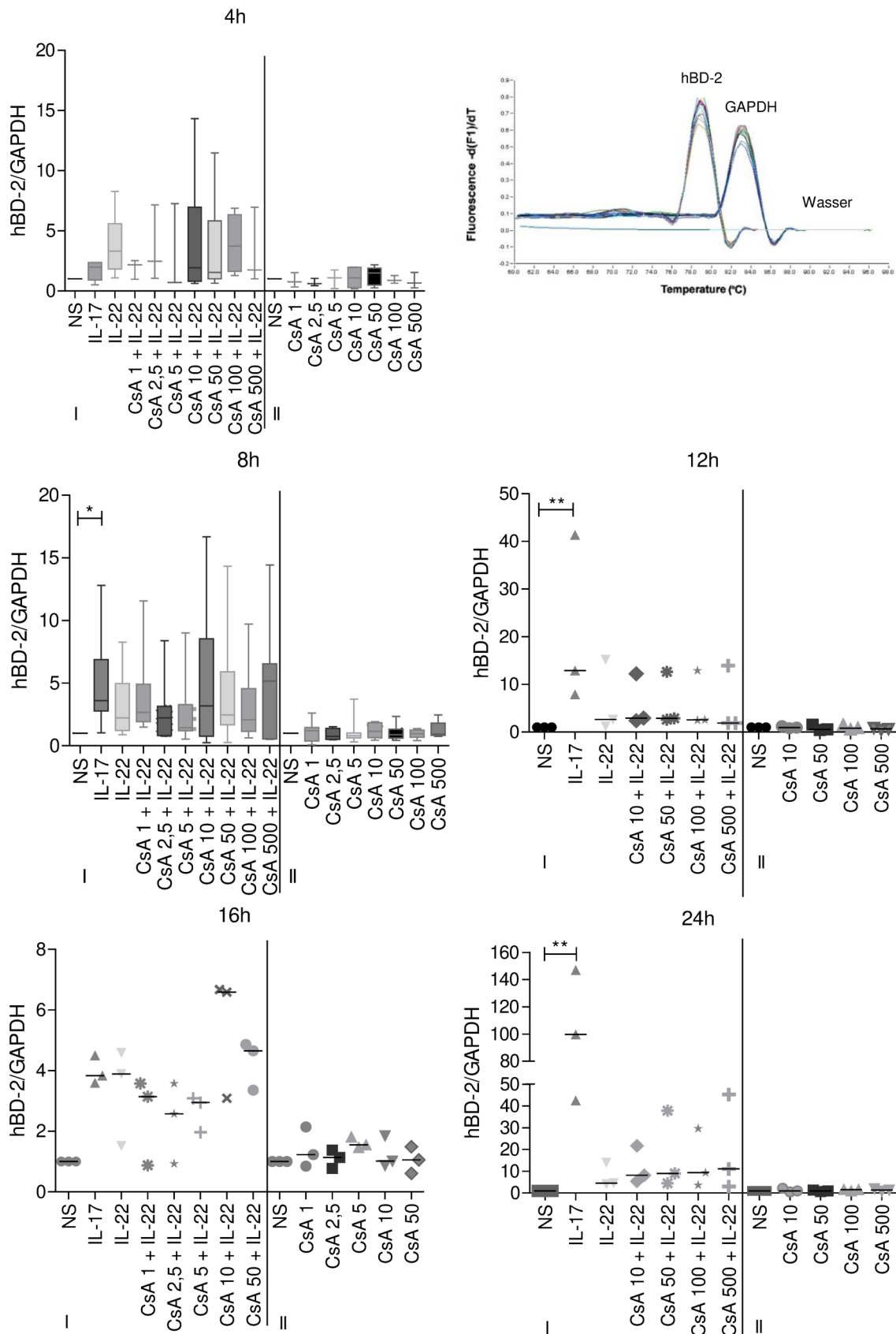
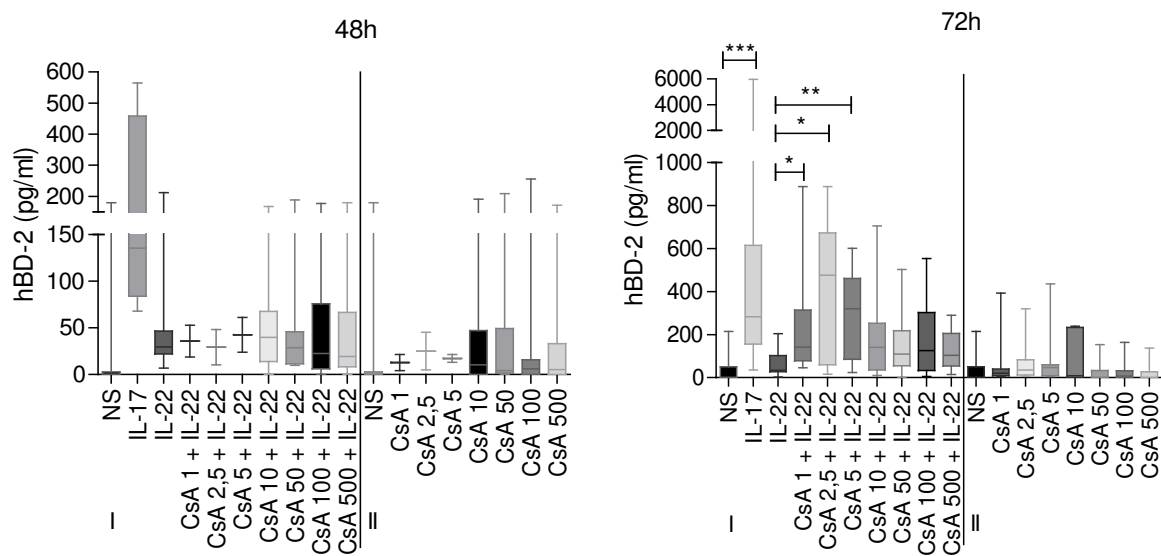


Abb. 14: Einfluss von Ciclosporin A auf durch IL-22 induziertes hBD-2 auf mRNA-Ebene von Keratinozyten

I: Stimulationsansatz mit IL-22 II: Kontrollansatz mit CsA

Keratozyten wurden mit CsA (anteilig 1, 2.5, 5, 10, 50, 100, 500 ng/ml) 1h vorinkubiert und danach für jeweils 4h, 8h, 12h, 16h und 24h mit IL-22 (50 ng/ml) stimuliert. hBD-2 mRNA-Expression wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR ermittelt. Weiterhin abgebildet ist der spezifische Schmelzpunkt von GAPDH, hBD-2 sowie die Wasserkontrolle (4h: n=3-6, Median, 50%; 8h: n=7-10, Median, 50%; 12h, 16h, 24h: n=3, Einzelwerte, Median).

Die statistische Signifikanz wurde für die Gruppen I und II jeweils getrennt nach Testung auf Normalverteilung mittels Friedman-Test (ANOVA) und Dunn's Post-Test bestimmt.



**Abb. 15: Einfluss von Ciclosporin A auf die IL-22 induzierte Sekretion von hBD-2 in Keratozyten**

I: Stimulationsansatz mit IL-22 II: Kontrollansatz mit CsA

Keratozyten wurden nach vierstündiger Vorinkubation mit CsA (1, 2.5, 5, 10, 50, 100, 500 ng/ml) für je 48h und 72h mit IL-22 (50 ng/ml) stimuliert. Die hBD-2-Sekretion wurde mittels ELISA gemessen (48h: n=3-7, Median, 50%; 72h: n=7, Median, 50%).

Die statistische Signifikanz wurde für die Gruppen I und II jeweils getrennt nach Testung auf Normalverteilung mittels Friedman-Test (ANOVA) und Dunn's Post-Test bestimmt.

### 3.3.3.3 Einfluss von Tacrolimus auf IL-22 induziertes hBD-2 in Keratinozyten

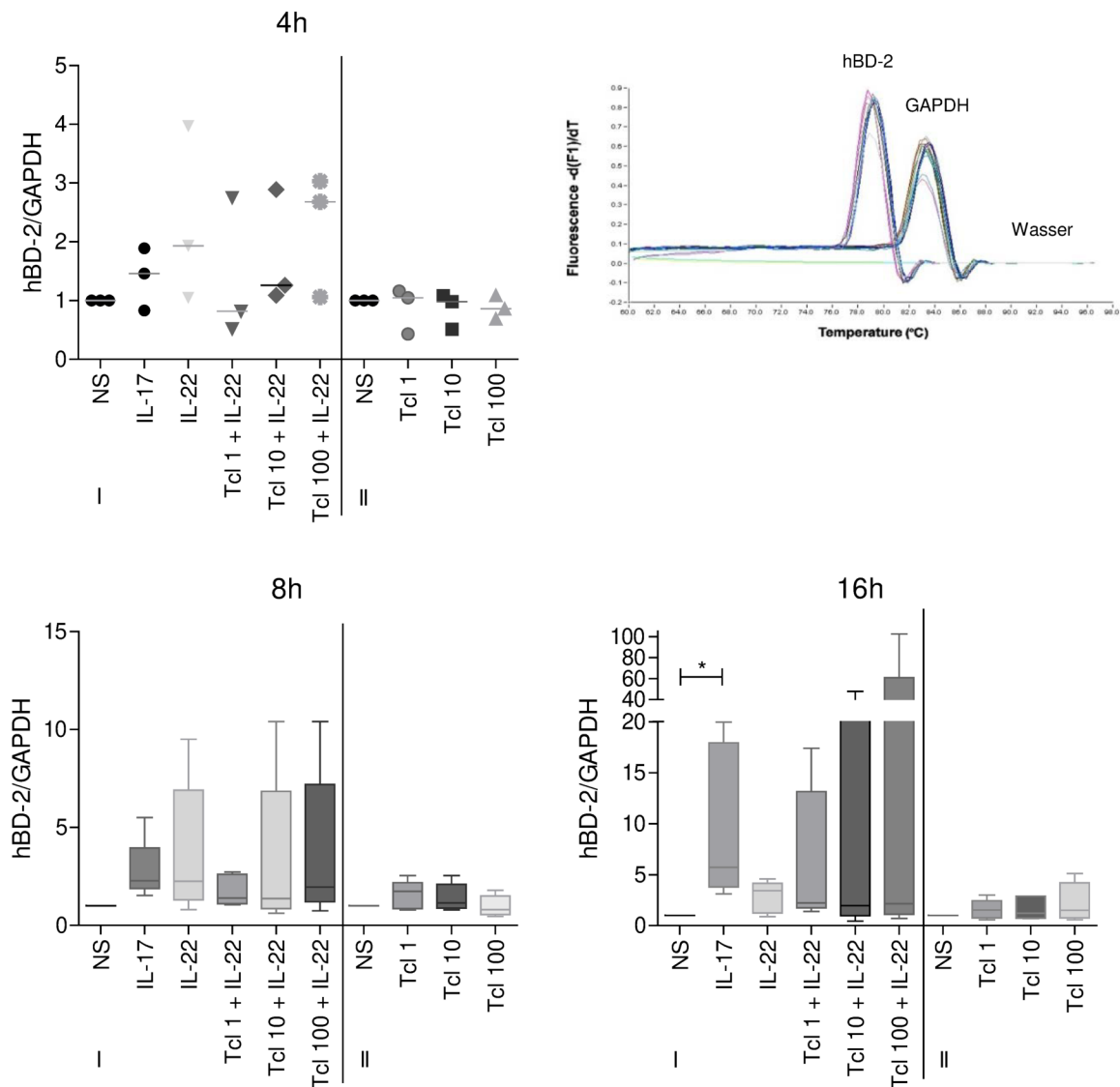
Nachdem mit Kombination von CsA und IL-22 eine Hochregulation von hBD-2 nach 72-stündiger Inkubation beobachtet worden war, sollte untersucht werden, ob dies ein spezifisch CsA-abhängiger Effekt ist oder ob es Hinweise auf einen grundsätzlichen Calcineurin-abhängigen Effekt gibt. Daher wurde mit Tacrolimus (Tcl) ein weiterer Calcineurin-Inhibitor ausgewählt, der im Gegensatz zu CsA nicht am Cyclophilin des Calcineurins, sondern am FKPB12 bindet.

Hierzu wurden humane Keratinozyten mit Tcl (1, 10, 100 ng/ml) vorinkubiert und im Anschluss mit IL-22 (50 ng/ml) stimuliert.

Um die Regulation von hBD-2 auf mRNA-Ebene zu bestimmen, wurden die Zellen für 1h mit Tcl vorinkubiert und danach mit IL-22 für jeweils 4h, 8h, 16h und 24h stimuliert (Abb. 16).

Um die hBD-2-Sekretion auf Proteinebene zu bestimmen, wurden die Keratinozyten zunächst mit Tcl 4h inkubiert, gefolgt von einer je 48- oder 72-stündigen Stimulation mit IL-22 (Abb. 17).

Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene ließ sich unter diesen Bedingungen ein eindeutiger Effekt von Tcl auf die hBD-2-Expression bzw. -Sekretion nachweisen.

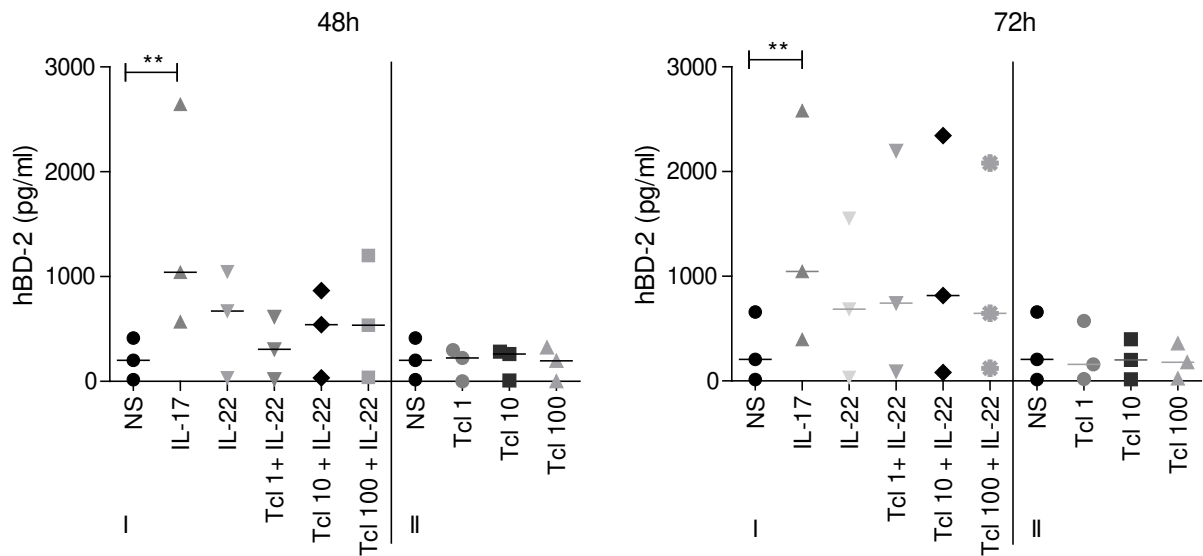


**Abb. 16: Einfluss von Tacrolimus auf die IL-22 induzierte Hochregulation von hBD-2 auf mRNA-Ebene von Keratinozyten**

I: Stimulationsansatz mit IL-22 II: Kontrollansatz mit Tcl

Keratinozyten wurden mit Tcl (1, 10, 100 ng/ml) 1h vorinkubiert und anschließend mit IL-22 (50 ng/ml) für 4h, 8h, 16h und 24h stimuliert. Der 24h-Wert ist hier aufgrund technischer Durchführungsfehler nicht gezeigt. HBD-2 mRNA-Expression wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR ermittelt (4h: n=3, Median, Einzelwerte; 8h, 16h: n=7, Median, 50%).

Die statistische Signifikanz wurde für die Gruppen I und II jeweils getrennt nach Testung auf Normalverteilung mittels Friedman-Test (ANOVA) und Dunn's Post-Test bestimmt.



**Abb. 17: Einfluss von Tacrolimus auf die IL-22 induzierte hBD-2-Sekretion von Keratinozyten**

I: Stimulationsansatz mit IL-22 II: Kontrollansatz mit TcI

Keratinozyten wurden mit TcI (1, 10, 100 ng/ml) für 4h vorinkubiert und anschließend für je 48h und 72h mit IL-22 (50 ng/ml) stimuliert. Die hBD-2-Sekretion wurde mittels ELISA gemessen (n=3, Einzelwerte, Median).

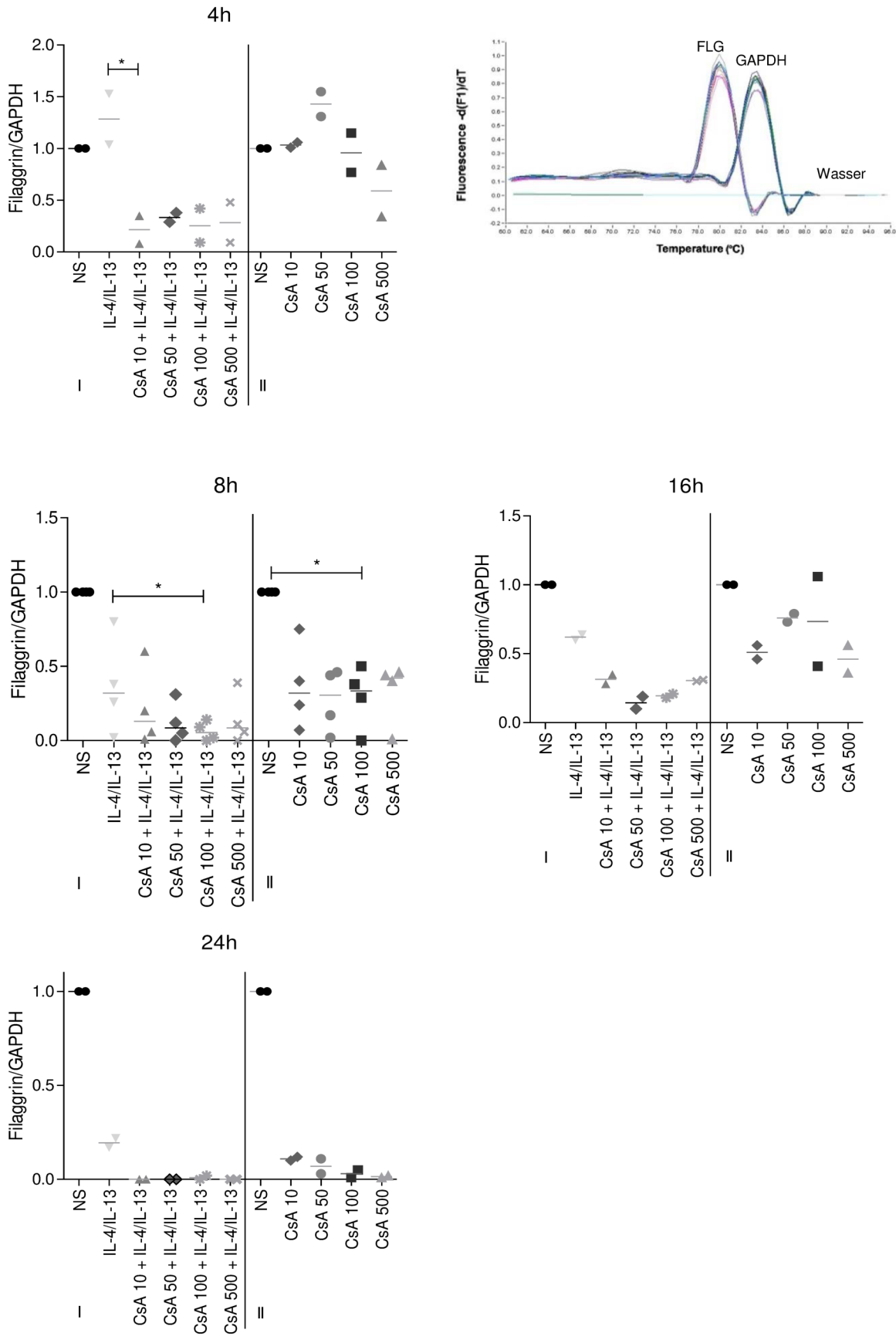
Die statistische Signifikanz wurde für die Gruppen I und II jeweils getrennt nach Testung auf Normalverteilung mittels Friedman-Test (ANOVA) und Dunn's Post-Test bestimmt.

### 3.3.4 Wirkung von Ciclosporin A auf die Filaggrinexpression in Keratinozyten nach Stimulation mit IL-4 und IL-13

Patienten mit akuter atopischer Dermatitis können an einem Filaggrin-Mangel leiden, der durch die Inflammation mit erhöhter Nachweisbarkeit von IL-4 und IL-13 induziert wird.<sup>87</sup> Unter *in vitro* nachgestellten Bedingungen sollten hier mögliche CsA-Effekte auf die Filaggrin-Expression in Keratinozyten untersucht werden.

Humane Keratinozyten wurden daher mit CsA (10, 50, 100, 500 ng/ml) für 1h vorinkubiert und anschließend mit IL-4 und IL-13 (je 50 ng/ml) für 4h, 8h, 16h oder 24h stimuliert.

Die Expression von Filaggrin wurde nach mindestens achtstündiger Stimulation mit IL-4 und IL-13 wie beschrieben herunterreguliert. Auch CsA alleine hatte unter den meisten Bedingungen einen hemmenden Effekt auf die Filaggrinexpression. Durch die Kombination von CsA mit IL-4/IL-13 wurde die Expression von Filaggrin noch zusätzlich nach unten reguliert (Abb 18).



**Abb. 18: Einfluss von Ciclosporin A auf die durch IL-4 und IL-13 verminderte Filaggrin-Expression auf mRNA-Ebene von Keratinozyten**

I: Stimulationsansatz mit IL-4 und IL-13 II: Kontrollansatz mit CsA

Keratinozyten, wurden für 1h mit CsA (10, 50, 100, 500 ng/ml) vorinkubiert und anschließend mit IL-4 und IL-13 (je 50 ng/ml) für 4h, 8h, 16h oder 24h stimuliert. Filaggrin-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR ermittelt. Die spezifischen Schmelzpunkte von FLG, GAPDH, sowie die Wasserkontrolle sind rechts oben dargestellt (4h, 16h, 24h: n=2, Median, Einzelwerte; 8h: n=4, Median, 50%).

Die statistische Signifikanz wurde für die Gruppen I und II jeweils getrennt nach Testung auf Normalverteilung mittels Friedman-Test (ANOVA) und Dunn's Post-Test bestimmt.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Wirkung von Ciclosporin A auf T-Lymphozyten

CsA wirkt selektiv inhibierend auf T-Lymphozyten, vorrangig auf die Fraktion der T-Helferzellen, jedoch wurden hemmende Effekte auch auf T-Suppressorzellen gezeigt. Die Wirkung beruht auf einer Blockierung der intrazellulären Signalkaskade, sodass die vollständige T-Zellaktivierung durch Inhibition der Produktion von v.a. IL-2 und IFN- $\gamma$  ausbleibt.<sup>152 188</sup> Inwieweit es direkte Wirkungen auf einzelne an der Pathogenese von AD sowie Psoriasis relevante Zytokine und Membranmoleküle gibt, ist noch nicht vollständig erforscht.

Im ersten Teil der hier beschriebenen Experimente ging es um den Nachweis direkter Wirkungen von CsA auf pathogenetisch interessante Membranmoleküle und auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine von T-Lymphozyten.

#### 4.1.1 Einfluss von Ciclosporin A auf CLA<sup>+</sup>- und CCR6<sup>+</sup>-T-Zellen

Das Membranmolekül CLA, das auf Memory-T-Zellen ausgebildet wird, ermöglicht den Eintritt der Zellen aus der Zirkulation in die Dermis. Dieser Prozess erfolgt über Interaktion von zirkulierenden CLA<sup>+</sup>-T-Zellen mit dem Adhäsionsmolekül E-Selektin auf Endothelzellen.<sup>196</sup> Picker et al. konnten zeigen, dass 85% der T-Zell-Infiltrate in diversen inflammatorischen Hautläsionen CLA<sup>+</sup> sind, jedoch nur 15% der T-Zellen im Blut.<sup>22</sup> Im Gegensatz hierzu wird geschätzt, dass ca. 98% der CLA<sup>+</sup>-Memory-T-Zellen unter Ruhebedingungen in gesunder Haut angesiedelt sind.<sup>195</sup> Dies lässt den Rückschluss zu, dass im Entzündungsstadium auch eine Migration der T-Zellen von der Haut zurück in die Blutgefäße stattfinden muss, sodass es durch Rekrutierung weiterer Zellen zu einer Zunahme der Entzündungsreaktion kommt. Eine pathogenetisch wichtige Bedeutung wird CLA auch bei der Initiierung von Läsionen der AD zugeschrieben. Patienten mit AD reagierten auf Allergene von Hausstaubmilben<sup>197</sup> und *S. aureus*<sup>198</sup> mit einem Anstieg an CLA<sup>+</sup>-T-Zellen. Weiterhin produzieren zirkulierende CLA<sup>+</sup>-T-Zellen von Atopikern spontan IL-4<sup>197</sup> und IL-13<sup>199</sup>, die Markerzytokine der AD.

Die überwiegende Mehrzahl der T-Zellen in akuten psoriatischen Läsionen sind ebenfalls CLA<sup>+</sup> <sup>200</sup>, hingegen gibt es eine inverse Korrelation des PASI mit der Menge an zirkulierenden CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>-Zellen. Dieser Zusammenhang ist möglicherweise durch die Migration der Zellen in die läsionale Haut erklärt, sodass die Anzahl an peripheren CLA<sup>+</sup>-T-Zellen abnimmt. <sup>201</sup>

Lee et al. konnten einen positiven Effekt von CsA auf die Anzahl an CD3<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut bei Kindern mit AD nachweisen. Dieser ging ebenfalls mit einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptome einher. <sup>202</sup> Auch auf CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in psoriatischen Läsionen bewirkte die 12-wöchige Anwendung von CsA eine kontinuierliche Herunterregulation von CLA, v.a. nach 3-6 Wochen. <sup>203</sup> Hier konnte passend zu diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass CD3<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>-T-Lymphozyten von gesunden Spendern durch die Wirkung von CsA die Expression ihres Membranmoleküls konzentrationsabhängig herunterregulieren (Abb. 4, Tab. 13). Daher kann sich die hier gezeigte herunterregulierende Wirkung von CsA mittelbar auch auf die Anzahl an CLA<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Haut und somit auf den Grad der Inflammation bei AD und Psoriasis auswirken.

Der Chemokinrezeptor CCR6, der auch auf ruhenden Memory-T-Zellen exprimiert wird, ist beteiligt an der Migration der Zellen in die Haut und daher ebenfalls als „skin homing molecule“ bekannt. <sup>204</sup> Bei Psoriasis-Patienten ist CCR6 auf T-Lymphozyten wie auch sein Ligand CCL20 auf Keratinozyten signifikant erhöht, vor allem ist CCR6 auch auf CLA<sup>+</sup>-Memory-T-Zellen koexprimiert zu finden. <sup>205</sup>

Im Vergleich zu Psoriatikern und Gesunden ist die Menge an CCR6<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Blut bei Patienten mit AD reduziert <sup>206</sup>, dagegen enthalten ekzematöse Hautläsionen bei AD eine erhöhte Anzahl an CCR6<sup>+</sup>-Zellen. <sup>101</sup> In den hier gezeigten Experimenten hatte CsA in der höchsten eingesetzten Konzentration einen tendenziell herunterregulierenden Effekt auf die Expression des Rezeptors CCR6 (Abb. 5). Da CCR6 insbesondere auf Th17- und Th22-Zellen exprimiert wird, könnte bereits eine diskrete Herunterregulation des Rezeptors einen Einfluss auf das T-Zellinfiltrat in Hautläsionen bei der Th17-polarisierten Psoriasis haben.

Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass mRNA-Level von CCR6 im peripheren Blut positiv mit dem PASI korrelieren. <sup>207</sup>

Auch bei der AD könnte CsA die Anzahl der in die Haut migrierenden CCR6<sup>+</sup>-T-Zellen reduzieren und somit grundsätzlich zu einem verminderten Entzündungszustand beitragen.

#### 4.1.2 Einfluss von Ciclosporin A auf IL-17, IL22 und IL-23R

Hautinfektionen mit *Staphylococcus aureus* sind häufig in Läsionen der AD zu finden und können den Schweregrad der Erkrankung negativ beeinflussen. Auch bei Psoriatikern ist eine Korrelation von Schweregrad der Erkrankung und dem Nachweis von *S. aureus* beschrieben.<sup>208</sup> Bakterienkolonien dieses Erregers lassen sich zwischen den Schichten von Keratinozyten der oberen Epidermis finden.<sup>209</sup> Superantigene wie SEB, das von *S. aureus* hergestellt wird, aktivieren T-Zellen und wirken somit proinflammatorisch.<sup>210</sup> Niebuhr et al. konnten zeigen, dass SEB zu einer gesteigerten IL-22-Produktion in PBMC und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen führt.<sup>102</sup> Auch konnten die Gruppe aus Hannover und andere Autoren in vorangegangenen Arbeiten beobachten, dass IL-17 unter SEB-Stimulation von CD4<sup>+</sup>-Zellen und von speziellen T-Zell-Klonen vermehrt sezerniert wird.<sup>94 102</sup>

In den Experimenten wurde hier bestätigt, dass eine SEB-Stimulation von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu einer Heraufregulation von IL-22 führt (Abb. 6B). Die Produktion von IL-17 wurde dagegen durch SEB herunterreguliert (Abb. 6A). Der Effekt auf IL-17 war überraschend und widerspricht vorbeschriebenen Erkenntnissen. Jedoch betrifft die hier gemessene Fraktion alle T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>), somit auch naive T-Zellen, die auch unter TCR-Aktivierung nur niedrige Level von IL-17 erzeugen, wie Chen et al. zuvor beschrieben haben.<sup>211</sup> Möglicherweise führt die Wirkung von SEB bei Gesunden daher nicht initial zu einer „inflammatorischen Reaktion“ im Sinne eines IL-17-Anstiegs. Die Expression von IL-23R auf Th17-Zellen entsteht während der Polarisierung auf der IL-23/Th17-Achse.<sup>212</sup> Erstmals konnte hier gezeigt werden, dass IL-23R durch SEB auf CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten herunterreguliert wird (Abb. 6C).

CsA führte zu einer weiteren Herunterregulation von IL-17 (Abb. 6A) und hatte somit einen antiinflammatorischen Effekt, was zur klinischen Verbesserung des Hautzustands bei AD und Psoriasis unter CsA-Behandlung beitragen könnte. Der hemmende Effekt von CsA auf IL-17 war relativ spezifisch, denn eine Regulation von CsA auf IL-22 und die Expression des IL-23R konnte unter gleichen experimentellen Bedingungen hier nicht beobachtet werden (Abb. 6B und 6C).

## 4.2 Wirkung von Ciclosporin A auf Th17-Zellen

Nachdem im ersten Teil T-Lymphozyten allgemein untersucht wurden, ging es im zweiten Teil der Arbeit darum herauszufinden, welche spezifischen Wirkungen CsA auf Th17-Zellen hat. Th17-Zellen gelten als Schlüsselzellen in der Pathogenese der Psoriasis und sind in psoriatischen Läsionen wie auch im peripheren Blut deutlich erhöht nachweisbar.<sup>125 130</sup> Auch bei Patienten mit AD zeigt sich eine vermehrte Anzahl an Th17-Zellen in akuten ekzematösen Läsionen sowie im peripheren Blut<sup>92 93</sup>, wobei die Menge im Vergleich zu Psoriatikern geringer ist.<sup>64</sup>

Daher ist die therapeutische Wirkung von CsA auf diese Subgruppe von besonderem Interesse. Eine supprimierende Wirkung von CsA (10 bis 10.000 ng/ml) auf PBMC und Th17-Zellen im Hinblick auf die Produktion von IL-17 wurde bereits 2008 beschrieben.<sup>213</sup> Ebenfalls zeigte eine Arbeitsgruppe aus Japan nach Abschluss der hier beschriebenen Experimente, dass CsA (100 ng/ml, 1000 ng/ml) nicht nur die IL-17-Produktion von CD4<sup>+</sup>-Memory-T-Zellen, sondern auch die Differenzierung von naiven T-Zellen in Memory-T-Zellen unterbindet.<sup>214</sup>

### 4.2.1 Polarisierungsmuster

Antigenspezifische CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-Th17-Zellen können unter unterschiedlichen Polarisierungsbedingungen entstehen, d.h. es führen verschiedene Zytokin-Zusammensetzungen zur Bildung von Th17-Zellen, wobei die Wichtigkeit der einzelnen Zytokine unterschiedlich bewertet wird. In den hier gezeigten Experimenten wurden CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-T-Zellen mit anti-CD3, anti-CD28 sowie IL-1 $\beta$  und IL-23 zu Th17-Zellen polarisiert. Wie die Arbeitsgruppe in Hannover und andere Autoren<sup>128 215 216</sup> zeigen konnten, werden unter diesen Polarisierungsbedingungen Th17-Zellen generiert, die im Vergleich zu einer Polarisierung mit IL-6 und TGF- $\beta$  signifikant mehr IL-17 und IL-22 exprimieren. Diese Ergebnisse ließen sich bei den hier generierten Th17-Zellen bestätigen.

IL-1 $\beta$  konnte *in vitro* bei Psoriasis-Patienten im Zytosol von Keratinozyten nachgewiesen werden.<sup>217</sup> Zusammen mit von aktivierten DCs abgegebenem IL-23, das als pathogenetisches Zytokin der Psoriasis in der IL-23/Th17-Achse gilt, kommt es zur Entwicklung und Expansion von Th17-Zellen.<sup>218</sup> Der Ursprung der Zytokine *in vivo* rückt die pathogenetische Bedeutung der APC/T-Zell-Interaktion in den Vordergrund.

#### 4.2.2 Einfluss von Ciclosporin A auf die IL-17- und IL-22-Produktion

Nach 14-tägiger Polarisierung wurden Th17-Zellen mit SEB stimuliert und die Wirkung von verschiedenen Konzentrationen CsA untersucht. Zunächst führte die Stimulation mit SEB zu einer signifikanten Steigerung der IL-17- und IL-22-Sekretion, wobei auffiel, dass SEB eine stärkere Sekretion von IL-22 im Vergleich zu IL-17 induzierte. CsA reduzierte konzentrationsabhängig die durch SEB induzierte Menge an IL-17, was sowohl nach 24h als auch nach 48h nachweisbar war (Abb. 7). Der gleiche Effekt ließ sich für IL-22 nachweisen. Auch hier wurde die SEB induzierte Menge an IL-22 auf Proteinebene nach 24h sowie 48h durch CsA in einer konzentrationsabhängigen Weise gesenkt (Abb. 8). Passend zu diesen Ergebnissen wurde von einer anderen Arbeitsgruppe kürzlich ein inhibierender Effekt von CsA auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von Psoriasis-Patienten sowie Gesunden nachgewiesen, bei dem die Produktion von IL-22, IFN- $\gamma$  sowie IL-17 reduziert gemessen worden war.<sup>219</sup>

CsA entfaltet somit seinen Wirkmechanismus nicht ausschließlich über eine Inhibition von IL-2 als Wachstumsfaktor und Aktivator für T-Zellen<sup>220</sup>, sondern über eine Inhibition der SEB induzierten IL-17- und IL-22-Produktion von Th17-Zellen. Dies kann auch bei der Therapie der AD mit CsA von Relevanz sein, da die Hautkolonisation mit SEB produzierenden Staphylokokken hier in der akuten Phase über Aktivierung von Th17-Zellen zu Exazerbationen führen kann. Diese Reaktion könnte aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse bei Anwendung von CsA deutlich reduziert werden.

#### 4.3 Wirkung von Ciclosporin A auf Keratinozyten

In den ersten beiden Teilen der Arbeit wurden Effekte von CsA auf T-Lymphozyten und hier im Speziellen auf Th17-Zellen beleuchtet. Der Wirkmechanismus über die Bildung eines Immunophilin-Komplexes mit anschließender Bindung an das Zielmolekül Calcineurin ist gut charakterisiert.<sup>140 144</sup> Es entsteht neben der direkten Wirkung auf T-Lymphozyten in der Folge auch eine indirekte regulatorische Wirkung auf andere Effektorzellen, wie z.B. auf Endothel- oder Epithelzellen.

Im dritten Teil der Arbeit wurde daher untersucht, ob CsA Effekte auf humane Keratinozyten ausübt, die bei der Behandlung der AD und Psoriasis mit von Bedeutung sein könnten.

Es war bereits bekannt, dass CsA die Proliferation von murinen Keratinozyten reduziert sowie eine IFN- $\gamma$  induzierte Produktion von IL-10 von HaCaT-Zellen hemmt.<sup>221</sup> Ebenso konnten Haider et al. zeigen, dass neben der Herunterregulation proinflammatorischer Gene von Th17-Zellen auch „Downstream-Gene“ wie z.B. hBD-2, CCL20 sowie IL-1 $\beta$  in läsionaler Haut von Psoriatikern herunterreguliert werden.<sup>222</sup> Hieraus lässt sich ableiten, dass es ein direktes Bindungsmolekül für CsA, möglicherweise ebenfalls Calcineurin-vermittelt, gibt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass eine Calcineurin-Aktivität in der Cutis, bei genauerer Betrachtung vor allem in der Epidermis, nachweisbar ist.<sup>223</sup>

#### **4.3.1 Einfluss von Ciclosporin A auf Membranmoleküle von Keratinozyten**

Keratinozyten sind in der Lage ein großes Spektrum von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zu produzieren. Diese werden als Antwort auf vielfältige Stimuli, z.B. Endotoxine, UV-Strahlung und andere Zytokine gebildet.<sup>224</sup> Des Weiteren exprimieren sie auf ihrer Oberfläche Membranmoleküle und Rezeptoren. Während Moleküle der MHC-Klasse I konstitutiv exprimiert werden, werden andere Moleküle wie MHC-Klasse II, ICAM-1 (CD54) sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 unter Ruhebedingungen nur niedrig exprimiert. Unter Stimulation mit IFN- $\gamma$ , das an seinen Rezeptor auf Keratinozyten bindet, kommt es zu einer deutlichen Induktion von ICAM-1 sowie MHC-Klasse II-Molekülen, sowie zur weiteren Heraufregulation von MHC-Klasse I-Molekülen. Somit können theoretisch unter inflammatorischen Bedingungen vermehrt Peptide an T-Zellen präsentiert werden. Die Expression von CD80 und CD86 hingegen scheint durch inflammatorische Mediatoren wie IFN- $\gamma$ , SEB sowie verschiedenen Zytokinen nicht beeinflusst zu werden.<sup>225</sup>

In den hier dargestellten Experimenten ließen sich diese Befunde teilweise reproduzieren. Die Inkubation mit IFN- $\gamma$  führte zu einer Induktion der Membranmoleküle CD54 und dem MHC-Klasse II-Molekül HLA-DR. Auch CD86 wurde, anders als zuvor beschrieben, nach 48h Inkubationszeit mit IFN- $\gamma$  im Trend höher exprimiert (Abb. 9).

Es kam allerdings zu keiner deutlichen Regulation der Membranexpression von CD54, HLA-DR, CD80, CD86 oder CD154 nach Inkubation mit CsA alleine oder in Kombination mit IFN- $\gamma$  (Abb. 11).

Neben IFN- $\gamma$  als stimulierendes Molekül ist auch bekannt, dass IL-17 verschiedene Effekte auf Keratinozyten hat. IL-17 induziert nicht nur das antimikrobielle Peptid hBD-2<sup>94</sup>, sondern fördert auch die Abgabe des Chemokins CXCL8 sowie des Zytokins IL-6 in Patienten mit allergischer Kontaktdermatitis. Zudem wirkt es zusammen mit IFN- $\gamma$  synergistisch auf die erhöhte Expression von ICAM-1.<sup>228 229</sup> Daher wirkt IL-17 als ein potenter Verstärker der T-Zell-/Keratinozyten-Interaktion und kann somit zur Ausbildung von ekzematösen Läsionen beitragen.

In den Experimenten wurde hier gezeigt, dass CD54 auf Keratinozyten durch IL-17 nur dezent hochreguliert werden konnte (Abb. 12A), was mit Ergebnissen von Albanesi et al. übereinstimmt, die keine signifikante Regulation von ICAM-1 durch IL-17 sahen.<sup>228</sup> CsA führte zusammen mit IL-17 konzentrationsabhängig zu einer Herunterregulation von CD54, was mit zur antiinflammatorischen Wirkung des Immunsuppressivums beitragen könnte.

#### **4.3.2 Einfluss von Ciclosporin A auf die hBD2-Produktion in Keratinozyten**

HBD-2, das als eines der antimikrobiellen Peptide in der Haut eine wichtige Funktion zur Abwehr von Pathogenen übernimmt, hat in der Pathogenese der AD und Psoriasis eine unterschiedliche Bedeutung. Grundsätzlich weisen Patienten mit AD ein relatives hBD-2-Defizit im Vergleich zu psoriatischen Läsionen auf, jedoch ist die absolute Expression immer noch stärker als bei Gesunden.<sup>230</sup> Ebenfalls sind die hBD-2-Serum-Level im Blut von Psoriatikern im Vergleich zu Gesunden stark erhöht und korrelieren mit dem Schweregradscore PASI. Verschiedene Zytokine wirken als Induktoren auf die hBD-2-Sekretion von Keratinozyten. Dazu zählen IL-17, IL-22, IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Im Gegensatz dazu supprimieren die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 sowie IL-10 die hBD-2-Sekretion.<sup>16 96</sup>

Bei Psoriasis kann die durch IL-17, IL-22 sowie IFN- $\gamma$  heraufregulierte Expression von hBD-2 wahrscheinlich zur niedrigen Hautinfektionsrate beitragen.<sup>231</sup>

Bestätigend hierzu konnte hier eine signifikante Induktion von hBD-2 durch IL-17 auf mRNA- sowie Proteinebene gezeigt werden (Abb. 13). Dagegen zeigte sich, dass IL-22 die hBD-2-Transkription und -Sekretion unter den meisten Bedingungen nur gering auf nicht-signifikantem Niveau induzierte (Abb. 14 und 15).

HBD-2 selbst ist nicht ausschließlich ein induzierbares passives AMP, sondern modifiziert aktiv das umgebende Mikromilieu. HBD-2 wirkt über Interaktion mit CCR6 chemotaktisch auf unreife DCs, Memory-T-Zellen sowie Th17-Zellen und kann somit eine proinflammatorische Wirkung haben.<sup>18</sup> Interessanterweise werden die Zytokine IL-17 und IL-22 unterschiedlich reguliert. Während hBD-2 eher zu einer reduzierten Sekretion von IL-17 führt, wird IL-22 in mit anti-CD3 und anti-CD28 sowie hBD-2 stimulierten T-Zellen weiter herauf reguliert.<sup>96</sup>

Auf IL-17 induziertes hBD-2 hatte CsA in allen Konzentrationen eine herunterregulierende Wirkung auf mRNA- sowie Proteinebene, auf Proteinebene in höchster Konzentration auch signifikant (Abb. 13).

Überraschenderweise hatte CsA dagegen in Kombination mit IL-22 einen positiven Effekt auf hBD-2, welches nach 8h und 24h auf mRNA- sowie nach 72h auf Proteinebene in Keratinozyten heraufreguliert wurde (Abb. 14 und 15). Dabei war der Effekt in niedrigen Konzentrationen von unter 10 ng/ml nach 72h auf Proteinebene am stärksten ausgeprägt (Abb. 15). Aufbauend auf die Hypothese, dass diese Wirkung Calcineurin-vermittelt ist, wurde der Versuch auch mit dem Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus durchgeführt, wobei der stimulierende Effekt auf die hBD-2 Expression hier nicht beobachtet werden konnte (Abb. 16 und 17).

Die Wirkung von CsA auf hBD-2 unter Stimulation mit IL-22 könnte zu einem positiven Feedback-Loop im Sinne der Regeneration der antimikrobiellen Barriere führen. Unter therapeutischen Bedingungen könnte es somit neben der antiinflammatorischen Wirkung auf T-Lymphozyten auch zu einer direkten Wirkung auf die angeborene Immunabwehr unter Therapie mit CsA kommen. Möglicherweise ist diese Wirkung selbst dann relevant, wenn die Calcineurin-Spiegel bei CsA unter den therapeutisch wirksamen Bereich fallen, weil es vor allem bei niedrigen Konzentrationen zu einer aktiv unterstützenden Regeneration kommt.

Da hBD-2 bei Psoriatikern ohnehin sehr stark exprimiert wird, führt hier eine weitere Hochregulation vermutlich nicht unbedingt zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes, sondern könnte eher kontraproduktiv wirken, da hohe hBD-2 Serumlevel positiv mit der Erkrankungsschwere und dem PASI korrelieren. Da CsA jedoch gerade bei schweren Verlaufsformen gute therapeutische Erfolge erzielt, scheint der antiin-

flammatorische Effekt auf T-Lymphozyten diese Wirkung von Calcineurin-Inhibitoren auszugleichen.

#### **4.3.3 Einfluss von Ciclosporin A auf die durch IL-4 und IL-13 reduzierte Filaggrinexpression**

FLG ist ein wichtiges Protein der Hautbarriere, welches bei Patienten mit AD in Läsionen deutlich geringer exprimiert wird. Dabei kann das inflammatorische Th2-Milieu mit den Zytokinen IL-4 und IL-13 Barrieredefekte induzieren<sup>87</sup> und möglicherweise verstärkt die Defizienz von FLG in der Haut die Th2-Antwort.<sup>232</sup>

Die Herunterregulation von FLG durch IL-4 und IL-13 konnte hier reproduziert werden. Die zusätzliche Inkubation mit CsA führte nach 8h zu einer noch stärkeren Herunterregulation in tendenziell konzentrationsabhängiger Weise von FLG auf mRNA-Ebene (Abb. 18).

Somit scheint CsA direkte, jedoch keine regenerierenden Effekte auf FLG zu haben. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu einem Xenograft-Maus-Modell aus dem Jahr 1990, wo durch CsA keine Modulation von FLG nachgewiesen werden konnte.<sup>233</sup>

#### **4.4 Fazit und Ausblick**

Ziel dieser Arbeit war es Wirkungen von CsA auf humane T-Zellen und primäre humane Keratinozyten im Hinblick auf die Rezeptor- und Zytokinproduktion sowie auf Keratinozyten hinsichtlich der angeborenen Immunität zu untersuchen.

Die Herunterregulation der Sekretion von IL-17 und IL-22 von Th17-Zellen, aber auch von hBD-2 in Keratinozyten durch CsA kann die deutliche Verbesserung der Hautläsionen insbesondere bei Psoriasis, eventuell auch bei der atopischen Dermatitis erklären.

Die heraufregulierende Wirkung von CsA auf die Sekretion von hBD-2 auf Keratinozyten unter Stimulation mit IL-22 ist überraschend. Da der Effekt mit dem Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus nicht reproduziert werden konnte, sollte er in Folgeexperimenten näher untersucht werden. Interessant wäre hierbei die Untersuchung der Wirkung von CsA auf weitere für Hauterkrankungen pathogenetisch relevante AMPs, z. B. hBD-3, LL-37 oder RNase7. Des Weiteren könnten die Experimente unter glei-

chen Bedingungen mit T-Zellen sowie Keratinozyten von Spendern mit AD und Psoriasis wiederholt werden, um zu untersuchen, ob es krankheitsspezifische Unterschiede gibt, die eventuell genetische oder epigenetische Ursachen haben.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ciclosporin A (CsA) ist ein systemisch wirksamer Calcineurin-Inhibitor, der primär in der Transplantationsmedizin zum Einsatz kommt, jedoch auch in der Dermatologie zur Behandlung von Patienten mit schwerer Psoriasis oder schwerer atopischer Dermatitis (AD) eingesetzt wird und für diese Indikation bei Erwachsenen zugelassen ist. Der pharmakologische Wirkmechanismus von CsA zum Zeitpunkt der in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen war bekannt. Dennoch fehlten detaillierte Erkenntnisse über Effekte auf den Phänotyp bzw. auf Effektormoleküle von humanen Keratinozyten und T-Zellen, d.h. den beiden Zellpopulationen, die quantitativ den größten Anteil an Zielzellen bei der Psoriasis und AD darstellen.

Humane T-Zellen und primäre humane Keratinozyten wurden daher in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen mit CsA inkubiert und untersucht, um die inflammatorischen Bedingungen entzündeter Haut *in vivo* darzustellen. Dabei konnte eine vorhergehende Beobachtung aus der immundermatologischen AG in Hannover bestätigt werden, dass das staphylogene Exotoxin und Superantigen SEB die Zytokine IL-17 und IL-22 von T-Zellen deutlich heraufreguliert. CsA führte unter diesen Bedingungen, insbesondere in *in vitro* polarisierten Th17-Zellen, zu einer deutlichen und signifikanten Herunterregulation von IL-17 sowie IL-22. Dieses Ergebnis kann zum Verständnis der therapeutischen Wirkung von CsA auf die Psoriasis, bei der IL-17 eine Schlüsselrolle zugeschrieben wird und ebenso IL-22, das in der Haut deutlich überexprimiert ist, beitragen. Da IL-17 im akuten Stadium und IL-22 im weiteren Verlauf in der Haut auch bei der AD heraufreguliert zu finden sind, könnte die Beobachtung auch für diese Dermatose von Bedeutung sein.

Bei der Untersuchung primärer humaner Keratinozyten konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass das antimikrobielle Peptid „human Beta-Defensin-2“ (hBD-2) durch IL-17 deutlich heraufreguliert wird. CsA führte unter diesen Bedingungen zu einer signifikanten Herunterregulation, was sich *in vivo* positiv auf entzündliche Hauterkrankungen wie Psoriasis und AD auswirken kann, da die proinflammatorische Wirkung von hBD-2 in der Haut auf diese Weise reduziert wird. Andererseits könnte die antimikrobielle Abwehr in der Haut unter Therapie mit CsA reduziert werden, was insbesondere bei der AD, die mit staphylogenen Hautinfektionen assoziiert ist, relevant sein könnte.

Überraschenderweise wurde hBD-2 durch CsA signifikant heraufreguliert, wenn Keratinozyten mit IL-22 vorstimuliert wurden. Da Tacrolimus (Tcl), ein anderer Calcineurin-Inhibitor, unter gleichen Bedingungen nicht zu einer signifikanten Heraufregulation von hBD-2 führte, ist dieser Effekt pharmakologisch in Hinblick auf eine Calcineurin-abhängige Wirkung nicht interpretierbar und sollte in Folgeexperimenten näher untersucht werden, bevor Schlussfolgerungen aus dieser Beobachtung gezogen werden.

Weitere in dieser Arbeit gezeigte experimentelle Ansätze zeigten keine Effekte von CsA auf humane T-Zellen oder primäre humane Keratinozyten: so wurden weder die Membranexpression verschiedener Rezeptoren noch die Expression des Hautbarriereproteins Filaggrin (FLG) nach Inkubation mit CsA unter inflammatorischen Bedingungen deutlich reguliert.

Zusammenfassend können die hier beobachteten Effekte von CsA auf IL-17, IL-22 und hBD-2 unter inflammatorischen Bedingungen zum besseren Verständnis der pharmakologischen Wirkung von CsA bei entzündlichen Hauterkrankungen beitragen.

## 6 SCHRIFTENVERZEICHNIS

1. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008;17:1063-1072.
2. Volc-Platzer B, Leibl H, Luger T, Zahn G, Stingl G. Human epidermal cells synthesize HLA-DR alloantigens in vitro upon stimulation with gamma-interferon. *J Invest Dermatol* 1985;85:16-19.
3. Aubock J, Romani N, Grubauer G, Fritsch P. HLA-DR expression on keratinocytes is a common feature of diseased skin. *Br J Dermatol* 1986;114:465-472.
4. Albanesi C. Keratinocytes in allergic skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:452-456.
5. Kupper TS. The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol* 1990;94:146S-150S.
6. Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol* 1989;20:617-629.
7. Dustin ML, Singer KH, Tuck DT, Springer TA. Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon  $\gamma$  and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Exp Med* 1988;167:1323-1340.
8. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387:861.
9. Jensen JM, Proksch E. The skin's barrier. *G Ital Dermatol Venereol* 2009;144:689-700.
10. Fleckman P, Dale BA, Holbrook KA. Profilaggrin, a high-molecular-weight precursor of filaggrin in human epidermis and cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1985;85:507-512.
11. Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4097-4101.

12. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 2006;38:337-342.
13. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 2009;122:1285-1294.
14. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:328-340.
15. Schroder JM, Harder J. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:645-651.
16. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271-2279.
17. Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T. In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp Mol Pathol* 2003;74:180-182.
18. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999;286:525-528.
19. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science, 2012: xix, 868 p.
20. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-258.
21. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. In: *Annu Rev Immunol*; 1998. p. 201-223.
22. Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol* 1990;136:1053-1068.
23. Bottomly K. A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes. *Immunol Today* 1988;9:268-274.
24. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.

25. Abehsira-Amar O, Gibert M, Jolij M, Theze J, Jankovic DL. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Tho into Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 1992;148:3820-3829.
26. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015;74:5-17.
27. Livingston DH, Appel SH, Sonnenfeld G, Malangoni MA. The effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on neutrophil function. *J Surg Res* 1989;46:322-326.
28. Johnston RB, Jr., Kitagawa S. Molecular basis for the enhanced respiratory burst of activated macrophages. *Fed Proc* 1985;44:2927-2932.
29. Diamond RD, Lyman CA, Wysong DR. Disparate effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on early neutrophil respiratory burst and fungicidal responses to *Candida albicans* hyphae in vitro. *J Clin Invest* 1991;87:711-720.
30. Dellacasagrande J, Capo C, Raoult D, Mege JL. IFN-gamma-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J Immunol* 1999;162:2259-2265.
31. Johnson DR, Pober JS. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5183-5187.
32. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon- $\gamma$  mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994;265:106-109.
33. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998;111:645-649.
34. Spellberg B, Edwards JE, Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001;32:76-102.
35. Harris N, Gause WC. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends Immunol* 2011;32:80-88.
36. Punnonen J, de Vries JE. IL-13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J Immunol* 1994;152:1094-1102.

37. Lai YH, Mosmann TR. Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production. *J Immunol* 1999;162:78-87.
38. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3730-3734.
39. Werfel T. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009;129:1878-1891.
40. Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:313-324.
41. Leung DY. Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:302-318; quiz 319.
42. Shi HZ, Deng JM, Xu H, Nong ZX, Xiao CQ, Liu ZM, Qin SM, et al. Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1818-1821.
43. Gajewski TF, Goldwasser E, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. II. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1988;141:2635-2642.
44. Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988;140:4245-4252.
45. Ohmori Y, Hamilton TA. IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. *J Immunol* 1997;159:5474-5482.
46. Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN, Farber JM. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol* 2008;180:214-221.
47. Wright JF, Bennett F, Li B, Brooks J, Luxenberg DP, Whitters MJ, Tomkinson KN, et al. The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *J Immunol* 2008;181:2799-2805.

48. Dumont FJ. IL-17 cytokine/receptor families: Emerging targets for the modulation of inflammatory responses. *Expert Opin Ther Pat* 2003;13:287-303.
49. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, Khatcherian A, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 2008;159:1092-1102.
50. Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC. NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1999;162:5337-5344.
51. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 2007;8:369-377.
52. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 2004;190:624-631.
53. Burgler S, Ouaked N, Bassin C, Basinski TM, Mantel PY, Siegmund K, Meyer N, et al. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:588-595, 595 e581-587.
54. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-1132.
55. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010;467:967-971.
56. Dumoutier L, Louahed J, Renaud JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 2000;164:1814-1819.
57. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004;21:241-254.

58. Nagalakshmi ML, Murphy E, McClanahan T, de Waal Malefyt R. Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol* 2004;4:577-592.
59. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, Ramon M, et al. 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* 2009;123:1244-1252 e1242.
60. Duhén T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009;10:857-863.
61. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 2002;168:5397-5402.
62. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2009;10:864-871.
63. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009;119:3573-3585.
64. Guttman-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Zaba LC, Cardinale I, Nograles KE, Khatcherian A, et al. Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis. *J Immunol* 2008;181:7420-7427.
65. Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 2006;36:1309-1323.
66. Cavani A, Pennino D, Eyerich K. Th17 and Th22 in skin allergy. *Chem Immunol Allergy* 2012;96:39-44.
67. Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Taylor S, Ogg GS. Interleukin-22 downregulates filaggrin expression and affects expression of profilaggrin processing enzymes. *Br J Dermatol* 2011;165:492-498.
68. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005;174:3695-3702.

69. Williams H, Flohr C. How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:209-213.
70. Kapoor R, Menon C, Hoffstad O, Bilker W, Leclerc P, Margolis DJ. The prevalence of atopic triad in children with physician-confirmed atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:68-73.
71. Thomsen SF, Ulrik CS, Kyvik KO, Hjelmborg J, Skadhauge LR, Steffensen I, Backer V. Importance of genetic factors in the etiology of atopic dermatitis: a twin study. *Allergy Asthma Proc* 2007;28:535-539.
72. Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boguniewicz M, Eigenmann P, Hamid Q, et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Allergy* 2006;61:969-987.
73. Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:252-262.
74. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 1994;94:870-876.
75. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1993;186:23-31.
76. Oranje AP, Glazenburg EJ, Wolkerstorfer A, de Waard-van der Spek FB. Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *Br J Dermatol* 2007;157:645-648.
77. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008;358:1483-1494.
78. Elias PM, Hatano Y, Williams ML. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1337-1343.
79. Hsu CK, Akiyama M, Shimizu H. Update on filaggrin mutations and atopic dermatitis. *Expert Rev Dermatol* 2010;5:315-323.
80. Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011;365:1315-1327.

81. Brown SJ, McLean WH. Eczema genetics: current state of knowledge and future goals. *J Invest Dermatol* 2009;129:543-552.
82. Jungersted JM, Scheer H, Mempel M, Baurecht H, Cifuentes L, Hogh JK, Hellgren LI, et al. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy* 2010;65:911-918.
83. Elias PM, Steinhoff M. "Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008;128:1067-1070.
84. De Benedetto A, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol* 2012;132:949-963.
85. Hudson TJ. Skin barrier function and allergic risk. *Nat Genet* 2006;38:399-400.
86. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 1998;19:359-361.
87. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:150-155.
88. Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol* 2011;2.
89. Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 2003;171:3262-3269.
90. Mempel M, Lina G, Hojka M, Schnopp C, Seidl HP, Schäfer T, Ring J, et al. High prevalence of superantigens associated with the egc locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:306-309.
91. Monti G, Tonetto P, Mostert M, Oggero R. *Staphylococcus aureus* skin colonization in infants with atopic dermatitis. *Dermatology* 1996;193:83-87.
92. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008;128:2625-2630.
93. Toda M, Leung DY, Molet S, Boguniewicz M, Taha R, Christodoulopoulos P, Fukuda T, et al. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:875-881.

94. Eyerich K, Pennino D, Scarponi C, Foerster S, Nasorri F, Behrendt H, Ring J, et al. IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:59-66 e54.
95. Howell MD, Fairchild HR, Kim BE, Bin L, Boguniewicz M, Redzic JS, Hansen KC, et al. Th2 cytokines act on S100/A11 to downregulate keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 2008;128:2248-2258.
96. Kanda N, Masahiro N, Tada Y, Ishikawa T, Sato S, Watanabe S. Human  $\beta$ -defensin-2 enhances IFN- $\gamma$  and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. *J Leukoc Biol* 2011;89:935-944.
97. Yamanaka K, Mizutani H. The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011;41:80-92.
98. Kosaka H, Yoshimoto T, Fujimoto J, Nakanishi K. Interferon-gamma is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. *Nat Med* 2008;14:437-441.
99. Seltmann J, Werfel T, Wittmann M. Evidence for a regulatory loop between IFN-gamma and IL-33 in skin inflammation. *Exp Dermatol* 2013;22:102-107.
100. Rebane A, Zimmermann M, Aab A, Baurecht H, Koreck A, Karelson M, Abram K, et al. Mechanisms of IFN-gamma-induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1297-1306.
101. Nakayama T, Fujisawa R, Yamada H, Horikawa T, Kawasaki H, Hieshima K, Izawa D, et al. Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 $\alpha$ /CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. *Int Immunol* 2001;13:95-103.
102. Niebuhr M, Scharonow H, Gathmann M, Mamerow D, Werfel T. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:1176-1183 e1174.
103. Christophers E. Genotyping psoriasis. *J Invest Dermatol* 2003;120:xvii.
104. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009;361:496-509.
105. Chandran V, Raychaudhuri SP. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Autoimmun* 2010;34:J314-321.

106. Watson W, Cann HM, Farber EM, Nall ML. The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* 1972;105:197-207.
107. Andressen C, Henseler T. [Inheritance of psoriasis. Analysis of 2035 family histories]. *Hautarzt* 1982;33:214-217.
108. Gudjonsson JE, Elder JT. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol* 2007;25:535-546.
109. Stern RS. Psoriasis. *Lancet* 1997;350:349-353.
110. Lowes MA, Suarez-Farinas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 2014;32:227-255.
111. Miller RA. The Koebner phenomenon. *Int J Dermatol* 1982;21:192-197.
112. Fry L, Baker BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol* 2007;25:606-615.
113. Weinstein GD, McCullough JL, Ross P. Cell proliferation in normal epidermis. *J Invest Dermatol* 1984;82:623-628.
114. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007;370:263-271.
115. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007;449:564-569.
116. Gilliet M, Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol* 2008;20:401-407.
117. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, Homey B, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 2009;206:1983-1994.
118. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, Gonzalez J, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2009;129:79-88.
119. Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Teunissen MB. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol* 2006;176:1908-1915.
120. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 1983;275:181-189.

121. Ferenczi K, Burack L, Pope M, Krueger JG, Austin LM. CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: blood and skin comparisons by flow cytometry. *J Autoimmun* 2000;14:63-78.
122. Yang S, Chen S, Hao L, Gao Y, Wang H, Liu J, Zhang X. Comparison of the phenotypes of infiltrating T cells in the dermis and epidermis of psoriatic skin. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* 2002;22:618-621.
123. Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol* 1993;101:701-705.
124. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 1999;113:752-759.
125. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, Bowman EP, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 2008;128:1207-1211.
126. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, Dhodapkar M, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med* 2004;199:125-130.
127. Yawalkar N, Tschärner GG, Hunger RE, Hassan AS. Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis. *J Dermatol Sci* 2009;54:99-105.
128. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950-957.
129. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm* 2005;2005:273-279.
130. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010;130:1373-1383.

131. Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007;8:967-974.
132. Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2007;9:461-467.
133. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I, Chimenti S, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2011;131:677-687.
134. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:763-776.
135. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003;101:2620-2627.
136. Coimbra S, Oliveira H, Reis F, Belo L, Rocha S, Quintanilha A, Figueiredo A, et al. Interleukin (IL)-22, IL-17, IL-23, IL-8, vascular endothelial growth factor and tumour necrosis factor-alpha levels in patients with psoriasis before, during and after psoralen-ultraviolet A and narrowband ultraviolet B therapy. *Br J Dermatol* 2010;163:1282-1290.
137. Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard FX, Nau F, et al. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol* 2007;150:407-415.
138. Lo YH, Torii K, Saito C, Furuhashi T, Maeda A, Morita A. Serum IL-22 correlates with psoriatic severity and serum IL-6 correlates with susceptibility to phototherapy. *J Dermatol Sci* 2010;58:225-227.
139. Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, Kasman I, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol* 2007;178:2229-2240.
140. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976;6:468-475.
141. Stähelin HF. The history of cyclosporin a (SandimmuneR) revisited: Another point of view. *Experientia* 1996;52:5-13.

142. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978;2:1323-1327.
143. Ruegger A, Kuhn M, Lichti H, Loosli HR, Huguenin R, Quiquerez C, von Wartburg A. [Cyclosporin A, a Peptide Metabolite from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai, with a remarkable immunosuppressive activity]. *Helv Chim Acta* 1976;59:1075-1092.
144. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66:807-815.
145. Stemmer P, Klee CB. Serine/threonine phosphatases in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 1991;1:53-64.
146. Cyert MS, Kunisawa R, Kaim D, Thorner J. Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7376-7380.
147. Kincaid RL, Takayama H, Billingsley ML, Sitkovsky MV. Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T lymphocytes and thymocytes. *Nature* 1987;330:176-178.
148. Alexander DR, Hexham JM, Crumpton MJ. The association of type 1, type 2A and type 2B phosphatases with the human T lymphocyte plasma membrane. *Biochem J* 1988;256:885-892.
149. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992;357:692-694.
150. Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 1991;352:803-807.
151. Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, Ahern D, Belshaw PJ, Alberg DG, Stamenkovic I, et al. Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J Clin Invest* 1994;93:1315-1320.
152. Rao A. NFATp, a cyclosporin-sensitive transcription factor implicated in cytokine gene induction. *J Leukoc Biol* 1995;57:536-542.
153. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* 1977;32:1017-1025.

154. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK 506: historical perspectives. *Transplant Proc* 1991;23:2713-2717.
155. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A. FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet* 1989;2:1000-1004.
156. Ruzicka T, Assmann T, Homey B. Tacrolimus: The drug for the turn of the millennium? *Arch Dermatol* 1999;135:574-580.
157. Wollenberg A, Sharma S, Von Bubnoff D, Geiger E, Haberstrok J, Bieber T. Topical tacrolimus (FK506) leads to profound phenotypic and functional alterations of epidermal antigen-presenting dendritic cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:519-525.
158. de Paulis A, Stellato C, Cirillo R, Ciccarelli A, Oriente A, Marone G. Anti-inflammatory effect of FK-506 on human skin mast cells. *J Invest Dermatol* 1992;99:723-728.
159. Hom JT, Estridge T. FK506 and rapamycin modulate the functional activities of human peripheral blood eosinophils. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:293-300.
160. Sengoku T, Kishi S, Sakuma S, Ohkubo Y, Goto T. FK506 inhibition of histamine release and cytokine production by mast cells and basophils. *Int J Immunopharmacol* 2000;22:189-201.
161. Williams HC. Clinical practice. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2005;352:2314-2324.
162. Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 2010;22:125-137.
163. Lebwohl M. The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis. *Int J Dermatol* 1999;38:16-24.
164. Wohlrab J. Maintenance therapy of psoriasis. *Hautarzt* 2006;57:661-665.
165. Werfel T, Schwerk N, Hansen G, Kapp A. The diagnosis and graded therapy of atopic dermatitis. *Dtsch Arztebl Int* 2014;111:509-520, i.
166. Remitz A, Reitamo S, Erkkö P, Granlund H, Lauerma AI. Tacrolimus ointment improves psoriasis in a microplaque assay. *Br J Dermatol* 1999;141:103-107.
167. Monastirli A, Georgiou S, Pasmazi E, Sakkis T, Badavanis G, Drainas D, Sagriotis A, et al. Calcipotriol plus short-contact dithranol: a novel topical combination therapy for chronic plaque psoriasis. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002;15:246-251.

168. Swinkels OQ, Prins M, Kucharekova M, de Boo T, Gerritsen MJ, van der Valk PG, van de Kerkhof PC. Combining lesional short-contact dithranol therapy of psoriasis with a potent topical corticosteroid. *Br J Dermatol* 2002;146:621-626.
169. Papp KA, Guenther L, Boyden B, Larsen FG, Harvima RJ, Guilhou JJ, Kaufmann R, et al. Early onset of action and efficacy of a combination of calcipotriene and betamethasone dipropionate in the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:48-54.
170. Pathirana D, Ormerod AD, Saiag P, Smith C, Spuls PI, Nast A, Barker J, et al. European S3-guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23 Suppl 2:1-70.
171. Alomar A, Berth-Jones J, Bos JD, Giannetti A, Reitamo S, Ruzicka T, Stalder JF, et al. The role of topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2004;151 Suppl 70 Dec 2004:3-27.
172. Ring J, Alomar A, Bieber T, Deleuran M, Fink-Wagner A, Gelmetti C, Gieler U, et al. Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26:1045-1060.
173. Amichai B. Psoriasis of the glans penis in a child successfully treated with Elidel (pimecrolimus) cream. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:742-743.
174. Freeman AK, Linowski GJ, Brady C, Lind L, Vanveldhuisen P, Singer G, Lebwohl M. Tacrolimus ointment for the treatment of psoriasis on the face and intertriginous areas. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:564-568.
175. Gribetz C, Ling M, Lebwohl M, Pariser D, Draelos Z, Gottlieb AB, Zaias N, et al. Pimecrolimus cream 1% in the treatment of intertriginous psoriasis: a double-blind, randomized study. *J Am Acad Dermatol* 2004;51:731-738.
176. Stuetz A, Baumann K, Grassberger M, Wolff K, Meingassner JG. Discovery of topical calcineurin inhibitors and pharmacological profile of pimecrolimus. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;141:199-212.
177. Billich A, Aschauer H, Aszódi A, Stuetz A. Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: Pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus. *Int J Pharm* 2004;269:29-35.
178. Yan J, Chen SL, Wang XL, Zhou W, Wang FS. Meta-analysis of tacrolimus ointment for atopic dermatitis in pediatric patients. *Pediatr Dermatol* 2008;25:117-120.

179. El-Batawy MM, Bosseila MA, Mashaly HM, Hafez VS. Topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *J Dermatol Sci* 2009;54:76-87.
180. Chen SL, Yan J, Wang FS. Two topical calcineurin inhibitors for the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Dermatolog Treat* 2010;21:144-156.
181. Svensson A, Chambers C, Ganemo A, Mitchell SA. A systematic review of tacrolimus ointment compared with corticosteroids in the treatment of atopic dermatitis. *Curr Med Res Opin* 2011;27:1395-1406.
182. Liao YH, Chiu HC, Tseng YS, Tsai TF. Comparison of cutaneous tolerance and efficacy of calcitriol 3 microg g(-1) ointment and tacrolimus 0.3 mg g(-1) ointment in chronic plaque psoriasis involving facial or genitofemoral areas: a double-blind, randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2007;157:1005-1012.
183. Carroll CL, Clarke J, Camacho F, Balkrishnan R, Feldman SR. Topical tacrolimus ointment combined with 6% salicylic acid gel for plaque psoriasis treatment. *Arch Dermatol* 2005;141:43-46.
184. Garritsen FM, Roekevisch E, van der Schaft J, Deinum J, Spuls PI, de Bruin-Weller MS. Ten years experience with oral immunosuppressive treatment in adult patients with atopic dermatitis in two academic centres. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29:1905-1912.
185. Systemic tacrolimus (FK 506) is effective for the treatment of psoriasis in a double-blind, placebo-controlled study. The European FK 506 Multicentre Psoriasis Study Group. *Arch Dermatol* 1996;132:419-423.
186. Simon D, Bieber T. Systemic therapy for atopic dermatitis. *Allergy* 2014;69:46-55.
187. Werfel T, Aberer W, Augustin M, Biedermann T, Folster-Holst R, Friedrichs F, Gieler U, et al. [Atopic dermatitis: S2 guidelines]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009;7 Suppl 1:S1-46.
188. Amor KT, Ryan C, Menter A. The use of cyclosporine in dermatology: part I. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:925-946; quiz 947-928.
189. Mrowietz U, Klein CE, Reich K, Rosenbach T, Ruzicka T, Sebastian M, Werfel T. Cyclosporine therapy in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009;7:474-479.

190. Finzi AF. Individualized short-course cyclosporin therapy in psoriasis. *Br J Dermatol* 1996;135 Suppl 48:31-34.
191. Griffiths CE, Dubertret L, Ellis CN, Finlay AY, Finzi AF, Ho VC, Johnston A, et al. Ciclosporin in psoriasis clinical practice: an international consensus statement. *Br J Dermatol* 2004;150 Suppl 67:11-23.
192. Colombo MD, Cassano N, Bellia G, Vena GA. Cyclosporine regimens in plaque psoriasis: an overview with special emphasis on dose, duration, and old and new treatment approaches. *ScientificWorldJournal* 2013;2013:805705.
193. Surber C, Itin P, Buchner S. Clinical controversy on the effect of topical ciclosporin: what is the target site? *Dermatology* 1992;185:242-245.
194. Leonardi A, Van Setten G, Amrane M, Ismail D, Garrigue JS, Figueiredo FC, Baudouin C. Efficacy and safety of 0.1% cyclosporine A cationic emulsion in the treatment of severe dry eye disease: A multicenter randomized trial. *Eur J Ophthalmol* 2016;26:287-296.
195. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K, Dowgiert RK, Kupper TS. The vast majority of CLA<sup>+</sup> T cells are resident in normal skin. *J Immunol* 2006;176:4431-4439.
196. Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 1991;349:796-799.
197. Santamaria Babi LF, Picker LJ, Perez Soler MT, Drzimalla K, Flohr P, Blaser K, Hauser C. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med* 1995;181:1935-1940.
198. Leung DYM, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995;181:747-753.
199. Akdis M, Akdis CA, Weigl L, Disch R, Blaser K. Skin-Homing, CLA<sup>+</sup> Memory T Cells Are Activated in Atopic Dermatitis and Regulate IgE by an IL-13-Dominated Cytokine Pattern: IgG4 Counter-Regulation by CLA<sup>-</sup> Memory T Cells. *J Immunol* 1997;159:4611-4619.

200. Teraki Y, Miyake A, Takebayashi R, Shiohara T. Homing receptor and chemokine receptor on intraepidermal T cells in psoriasis vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 2004;29:658-663.
201. Ferran M, Gimenez-Arnau AM, Bellosillo B, Pujol RM, Santamaria-Babi LF. Circulating CLA<sup>+</sup> T cell subsets inversely correlate with disease severity and extension in acute psoriasis but not in chronic plaque psoriasis. *Eur J Dermatol* 2008;18:647-650.
202. Lee SY, Shim JY, Kim JH, Kim BS, Seo HJ, Choi SO, Jang SO, et al. Cyclosporine treatment decreases the percentage of cutaneous lymphocyte antigen (CLA)(+)CD4(+) T cells in children with severe atopic dermatitis. *Allergy* 2004;59:1129-1130.
203. Chang SE, Min KS, Sung KJ, Moon KC, Koh JK, Choi JH. Effects of cyclosporine on the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) expression of the lymphocytes in psoriatic skin. *Korean J Dermatol* 2001;39:280-284.
204. Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol* 1999;162:186-194.
205. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 2000;164:6621-6632.
206. Leung DYM, Ong PY. The chemokine receptor CCR6 identifies interferon- $\gamma$  expressing T cells and is decreased in atopic dermatitis as compared with psoriasis. *J Invest Dermatol* 2002;119:1463-1464.
207. Yang Q, Wei, Z.-P., Mei, X.F., Quan, C., Liu, Y.-Q. Expression of CCR6, CCL20 and IL-17 mRNA in the peripheral blood of patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Dermatol* 2014;43:645-647.
208. Tomi NS, Kränke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:67-72.
209. Morishita Y, Tada J, Sato A, Toi Y, Kanzaki H, Akiyama H, Arata J. Possible influences of *Staphylococcus aureus* on atopic dermatitis - The colonizing

- features and the effects of staphylococcal enterotoxins. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1110-1117.
210. Cardona ID, Sang HC, Leung DYM. Role of bacterial superantigens in atopic dermatitis: Implications for future therapeutic strategies. *Am J Clin Dermatol* 2006;7:273-279.
211. Chen Z, Tato CM, Muul L, Laurence A, O'Shea JJ. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2007;56:2936-2946.
212. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006;27:17-23.
213. Zhang C, Zhang J, Yang B, Wu C. Cyclosporin A inhibits the production of IL-17 by memory Th17 cells from healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2008;42:345-352.
214. Tsuda K, Yamanaka K, Kitagawa H, Akeda T, Naka M, Niwa K, Nakanishi T, et al. Calcineurin inhibitors suppress cytokine production from memory T cells and differentiation of naïve T cells into cytokine-producing mature T cells. *PLoS One* 2012;7.
215. Liu H, Rohowsky-Kochan C. Regulation of IL-17 in human CCR6 + effector memory t cells. *J Immunol* 2008;180:7948-7957.
216. Mommert S, Gschwandtner M, Koether B, Gutzmer R, Werfel T. Human memory Th17 cells express a functional histamine H4 receptor. *Am J Pathol* 2012;180:177-185.
217. Dombrowski Y, Peric M, Koglin S, Kammerbauer C, Göß C, Anz D, Simanski M, et al. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med* 2011;3.
218. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009;129:1339-1350.
219. Shen E, Yang B, Li Y, Lin QI, Zou R, Huang H, Wu J, et al. CsA inhibits IL-22 production by memory CD4+ T cells from patients with psoriasis. *Arch Biol Sci* 2014;66:775-784.
220. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635-673.
221. Bäumer W, Kietzmann M. Effects of cyclosporin A and cilomilast on activated canine, murine and human keratinocytes. *Vet Dermatol* 2007;18:107-114.

222. Haider AS, Lowes MA, Suarez-Farinas M, Zaba LC, Cardinale I, Khatcherian A, Novitskaya I, et al. Identification of cellular pathways of "type 1," Th17 T cells, and TNF- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *J Immunol* 2008;180:1913-1920.
223. Smit NP, Van Rossum HH, Romijn FP, Sellar KJ, Breetveld M, Gibbs S, Van Pelt J. Calcineurin activity and inhibition in skin and (epi)dermal cell cultures. *J Invest Dermatol* 2008;128:1686-1690.
224. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;88:1-12.
225. Black AP, Ardern-Jones MR, Kasprovicz V, Bowness P, Jones L, Bailey AS, Ogg GS. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 2007;37:1485-1493.
226. Santamaria Babi LF, Moser R, Perez Soler MT, Picker LJ, Blaser K, Hauser C. Migration of skin-homing T cells across cytokine-activated human endothelial cell layers involves interaction of the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4), and the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *J Immunol* 1995;154:1543-1550.
227. Gaglia JL, Greenfield EA, Mattoo A, Sharpe AH, Freeman GJ, Kuchroo VK. Intercellular adhesion molecule 1 is critical for activation of CD28-deficient T cells. *J Immunol* 2000;165:6091-6098.
228. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 1999;162:494-502.
229. Pennino D, Eyerich K, Scarponi C, Carbone T, Eyerich S, Nasorri F, Garcovich S, et al. IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes. *J Immunol* 2010;184:4880-4888.
230. De Jongh GJ, Zeeuwen PLJM, Kucharekova M, Pfundt R, Van Der Valk PG, Blokx W, Dogan A, et al. High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2005;125:1163-1173.

231. Harder J, Schroder JM. Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol* 2005;77:476-486.
232. Brown SJ, McLean WHI. One remarkable molecule: Filaggrin. *J Invest Dermatol* 2012;132:751-762.
233. Kanitakis J, Urabe A, Haftek M, Thivolet J. The effect of cyclosporin A on proliferation and differentiation-associated antigens of normal human skin xenografted onto nude mice. *J Dermatol Sci* 1990;1:103-109.

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum
Ad	lat. an, bei, zu
AD	atopische Dermatitis
AMP	engl. <i>antimicrobial proteins</i> , antimikrobielle Proteine
APC	Allophycocyanin
APC	engl. <i>antigen-presenting cell</i> , Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
B-Zellen	engl. <i>b = bone marrow</i> , Knochenmarkzellen
BPE	engl. <i>bovine pituitary extract</i> , Rinderhypophysenextrakt
BSA	engl. <i>Bovine serum albumin</i> , bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCL	engl. <i>CC-chemokine ligand</i> , Chemokinligand
CCR	engl. <i>CC-chemokine receptor</i> , Chemokinrezeptor
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> , Einteilung Oberflächenmoleküle
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNS
CD40L	engl. <i>CD40 ligand</i> , CD40-Ligand
CD45RO <sup>+</sup>	engl. <i>memory t-cell</i> , T-Gedächtniszelle
CLA	engl. <i>cutaneous lymphocyte-associated antigen</i>
cm	engl. <i>centimeter</i> , Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CsA	Ciclosporin A
d=	Dichtegradient
d	engl. <i>days</i> , Tage
D	Dalton
DC	engl. <i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert

---

d.h.	das heißt
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	engl. <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-1	Fluoreszenz 1 (Grünes Spektrum im FACS, FITC)
FL-2	Fluoreszenz 2 (Orangerotes Spektrum im FACS, PE)
FL-3	Fluoreszenz 3 (Dunkelrot-Lila Spektrum im FACS, PerCP)
FL-4	Fluoreszenz 4 (Rotes Spektrum im FACS, APC)
FLG	Filaggrin
FKBP	engl. <i>FK506 binding protein</i> , FK506-bindende Proteine
FK506	Tacrolimus
for	engl. <i>forward</i>
FSC	engl. <i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht im FACS
g	Gramm
g	engl. <i>gravitational acceleration</i> , Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	engl. <i>gas chromatography</i> , Gaschromatographie
G-CSF	engl. <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
H	engl. <i>hour</i> , Stunde
hBD-2	engl. <i>human beta-defensin-2</i> , humanes Beta-Defensin-2
HC	engl. <i>hydrocarbon</i>
hEGF	engl. <i>human epidermal growth factor</i>
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i> , Histokompatibilitätsantigen
IAB	Iscove Medium mit 4% humanem AB-Serum
ICAM-1	engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i> (CD54)
IE	internationale Einheit
IFN	engl. <i>interferon</i> , Interferon
IgG, IgE	Immunglobulin G, Immunglobulin E
IL	engl. <i>interleukin</i> , Interleukon
IL-TIF	engl. <i>interleukin-t-cell inducing factor</i>

---

IL-22BP	engl. <i>interleukin-22 binding protein</i>
IL-22R	engl. <i>interleukin-22 receptor</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
LFA-1	engl. <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i> , bindet ICAM-1
LL37	antimikrobielles Peptid der Cathelicidine
M	Molar
MACS®	engl. <i>magnetic-activated cell sorting</i>
M-CSF	engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
Min.	Minute
mM	Millimolar
mRNA	engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> , Botenstoff-Ribonukleinsäure
MTX	Methotrexat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
ng	Nanogramm
NFAT <sub>c</sub>	engl. <i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	engl. <i>nuclear factor κB</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NMF	engl. <i>natural moisturizing factor</i>
NS	engl. <i>non-stimulated</i> , nicht-stimulierte Proben
P	engl. <i>probability</i> , Wahrscheinlichkeit
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PASI	engl. <i>Psoriasis Area and Severity Index</i>
PBMC	engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pDC	engl. <i>plasmacytoid dendritic cell</i>

---

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässr. Lsg.
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PUVA	Psoralen plus UV-A
rev	engl. <i>reverse</i>
rHu	engl. <i>recombinant human</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rT	reverse Transkriptase
s.	siehe
S. aureus	Staphylococcus aureus
SCORAD	engl. <i>SCORE</i> of Atopic Dermatitis
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SSC	engl. <i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht im FACS
s.u.	siehe unten
Tcl	Tacrolimus
TCI	engl. <i>topic calcineurin inhibitors</i> , topische Calcineurin-Inhibitoren
TCR	engl. <i>T-cell receptor</i>
TEWL	engl. <i>transepidermal water loss</i> , transepidermaler Wasserverlust
Th-Zellen	T-Helferzellen
T-Zellen	Thymusellen
TGF	engl. <i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
w/o	engl. <i>without</i> , ohne
7-AAD	7-Aminoactinomycin

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zellkulturmedien .....	17
Tab. 2:	Puffer.....	18
Tab. 3:	Lösungen .....	19
Tab. 4:	Zytokine.....	19
Tab. 5:	Antikörper .....	20
Tab. 6:	Primer.....	20
Tab. 7:	Reagenzien .....	21
Tab. 8:	Kits .....	23
Tab. 9:	Laborgeräte.....	24
Tab. 10:	Sonstiges Verbrauchsmaterial .....	25
Tab. 11:	Emissionswellenlänge der Fluoreszenzfarbstoffe .....	29
Tab. 12:	Verwendete Primer in der PCR.....	32
Tab. 13:	CD3 <sup>+</sup> CLA <sup>+</sup> -T-Lymphozyten nach Inkubation mit Ciclosporin A .....	36

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Wirkmechanismus von Ciclosporin A und Tacrolimus.....	13
Abb. 2:	Emissionsspektrum FACSCalibur™.....	30
Abb. 3:	Selektion („Gaten“) der Lymphozyten-Fraktion .....	35
Abb. 4:	Durchflusszytometrische Analyse von CD3 <sup>+</sup> CLA <sup>+</sup> -T-Lymphozyten nach Inkubation mit Ciclosporin A.....	35
Abb. 5:	Einfluss von Ciclosporin A auf die CCR6-Expression auf T-Lymphozyten.....	37
Abb. 6:	Einfluss von Ciclosporin A und SEB auf die Expression von IL-17 und IL-22 sowie auf die Membranexpression des IL-23R von bzw. auf T-Lymphozyten .....	38
Abb. 7:	Einfluss von Ciclosporin A auf die SEB induzierte Sekretion von IL-17 von polarisierten Th17-Zellen.....	40
Abb. 8:	Einfluss von Ciclosporin A auf die SEB induzierte Sekretion von IL-22 von polarisierten Th17-Zellen.....	41
Abb. 9:	Durchflusszytometrische Darstellung der Expression von Membranmolekülen unter IFN- $\gamma$ -Stimulation auf Keratinozyten .....	42
Abb. 10:	Expression von Membranmolekülen unter zeitkinetischer IFN- $\gamma$ -Stimulation auf Keratinozyten.....	43
Abb. 11:	Einfluss von Ciclosporin A und IFN- $\gamma$ auf die Expression von Membranmolekülen auf Keratinozyten .....	45
Abb. 12:	Einfluss von Ciclosporin A und IL-17 auf die Expression von Membranmolekülen auf Keratinozyten .....	47
Abb. 13:	Einfluss von Ciclosporin A auf IL-17 induziertes hBD-2 von Keratinozyten .....	48
Abb. 14:	Einfluss von Ciclosporin A auf durch IL-22 induziertes hBD-2 auf mRNA-Ebene von Keratinozyten .....	50
Abb. 15:	Einfluss von Ciclosporin A auf die IL-22 induzierte Sekretion von hBD-2 in Keratinozyten.....	51
Abb. 16:	Einfluss von Tacrolimus auf die IL-22 induzierte Hochregulation von hBD-2 auf mRNA-Ebene von Keratinozyten.....	53
Abb. 17:	Einfluss von Tacrolimus auf die IL-22 induzierte hBD-2-Sekretion von Keratinozyten .....	54
Abb. 18:	Einfluss von Ciclosporin A auf die durch IL-4 und IL-13 verminderte Filaggrin-Expression auf mRNA-Ebene von Keratinozyten .....	55

## 8 DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Werfel für die Bereitstellung des Themas sowie die intensive Betreuung vor, während und nach dem experimentellen Zeitraum danken. Ebenso gilt mein Dank meiner Hauptbetreuerin Dr. med. Katja Wichmann, die mir im Forscheralltag immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Meinem Ko-Betreuer Prof. Dr. med. Torsten Witte danke ich für konstruktive Kritik und Ideen, die die Experimente bereichert haben. Und speziell möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Lennart Rösner für die Korrekturen auf den letzten Metern bedanken.

Ohne die Rundumbetreuung „meiner“ MTA Petra Kienlin wäre die praktische Arbeit im Labor so nicht möglich gewesen und hätte vor allem nur halb so viel Spaß gemacht. Dafür danke ich dir herzlich, liebe Petra. Nicht unerwähnt bleiben sollen Kathrin Baumert und Gabi Begemann, die ebenso immer hilfsbereit und für mich ansprechbar waren. Danke auch an Dr. rer. nat. Susanne Mommert für den fachlichen Beistand bei allen PCRs und an Christina Hartmann für die professionell aufbereiteten Keratinozyten. Dem gesamten restlichen Laborteam, v.a. auch Manuela, Gitta und Maria, Ute, Susi und Jenny an dieser Stelle ein Dankeschön für jegliche Hilfeleistung, Tipps und Tricks.

Der HBRS, insbesondere Frau Dr. Susanne Kruse, vielen Dank dafür, dass durch StrucMed ein für Mediziner so toller Rahmen geschaffen wurde, der solch experimentelle Forschungsprojekte unterstützt und begleitet. Der Firma Novartis danke ich für die finanzielle Unterstützung der Experimente i. R. der Forschung zu CsA.

Besonderer Dank gilt auch meinem Freund Andreas Hamann und Frau Dr. Kleinemeier für die motivierenden Worte in den letzten 2 Jahren, die es schlussendlich ermöglicht haben diese Arbeit parallel zum Berufsleben fertigzustellen.

## **Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 6 und 7**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Effekte von Ciclosporin A auf Th17-Zellen und humane Keratinozyten“ in der Abteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Medizinischen Hochschule Hannover im Rahmen der Strukturierten Doktorandenausbildung (StrucMed) unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Werfel und Frau Dr. med. Katja Wichmann und der Ko-Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Torsten Witte ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Die Ergebnisse der Dissertation wurden im Rahmen einer Vortragssitzung zu zellulären, immunologischen und genetischen Grundlagen allergischer Erkrankungen auf dem 5. Deutschen Allergie Kongress am 09.09.2010 in Hannover vorgestellt.

Hannover, den 31.07.2017