

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut an der
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Direktor: Prof. Dr. Roland Kaufmann

Die Rolle des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs in der Acne inversa

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Angelina Dmitriev

aus Moskau, Russland

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referentin:	PD Dr. Claudia Bürger
Korreferent:	Prof. Dr. Manuel Kaulich
Tag der mündlichen Prüfung:	28.11.2022

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis.....	11
1 Einleitung	12
1.1 Aufbau und Funktion der Haut	12
1.2 Hidradenitis suppurativa	14
1.2.1 Definition und Epidemiologie	14
1.2.2 Klinik.....	15
1.2.2.1 Komorbiditäten.....	16
1.2.3 Ätiologie und Pathogenese	17
1.2.3.1 Pathomechanismus	17
1.2.3.2 Immundysregulation und Entzündung.....	18
1.2.3.3 Triggerfaktoren der Acne inversa	22
1.2.3.3.1 Rauchen und Adipositas	22
1.2.3.3.2 Genetische Prädisposition.....	23
1.2.3.3.3 Bakterien.....	23
1.2.4 Therapieoptionen.....	24
1.3 Gemeinsamkeiten der Psoriasis vulgaris und Hidradenitis suppurativa.....	28
1.4 Der mTORC1-Signalweg und seine Rolle in der Pathogenese inflammatorischer Dermatosen.....	30
1.5 Der JAK/STAT3-Signalweg und seine Rolle in entzündlichen Dermatosen...	33
1.6 Grundannahme und Zielsetzung.....	35
2 Materialien und Methoden	37
2.1 Materialien	37
2.1.1 Untersuchtes Gewebe	37
2.1.2 Verwendete Zelllinien	39
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	39
2.1.4 Antikörper	41

2.1.5	Zytokine.....	43
2.1.6	Chemische Inhibitoren.....	43
2.1.7	Verbrauchsmaterialien.....	44
2.1.8	Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer.....	44
2.1.9	Technische Geräte und Softwares.....	46
2.2	Methoden.....	47
2.2.1	Zellkultur.....	47
2.2.2	Gelelektrophorese und Western Blot.....	49
2.2.3	Histologische und immunhistochemische Färbungen.....	51
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Untersuchung der Aktivität des mTORC1-Singalwegs in Acne inversa-Läsionen 55	
3.2	Untersuchung des epidermalen Differenzierungsmusters in Acne inversa- Läsionen.....	61
3.3	Untersuchung der Proliferations- und Entzündungsaktivität in Acne inversa- Läsionen.....	67
3.4	Untersuchung der Signalkaskade downstream von mTOR.....	73
3.4.1	<i>In-vitro</i> -Untersuchung der Signalkaskade downstream von mTOR.....	73
3.4.2	Untersuchung der Signalkaskade downstream von mTOR in Acne inversa- Läsionen.....	77
4	Diskussion.....	82
4.1	Die Rolle des mTORC1-Signalwegs in der Acne inversa.....	82
4.2	Interaktion zwischen mTOR-Signalweg und JAK/STAT3-Signalweg.....	87
4.3	Bedeutung der Arbeit für das Verständnis der Pathogenese und die therapeutische Behandlung der Acne inversa.....	89
5	Zusammenfassung.....	94
6	Abstract.....	95
7	Literaturverzeichnis.....	97

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>
AI	<i>Acne inversa</i>
AISI	<i>Acne Inversa Severity Index</i>
AMP	<i>Antimikrobielles Peptid</i>
ANOVA	<i>analysis of variance (Varianzanalyse)</i>
AP	<i>alkalische Phosphatase</i>
AP-1	<i>Aktivator-Protein-1</i>
APS	<i>Ammoniumpersulfat</i>
BD	<i>β-Defensin</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin (Bovines Serumalbumin)</i>
CD3	<i>Cluster of Differentiation 3</i>
CED	<i>chronisch-entzündliche Darmerkrankungen</i>
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
CO ₂	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern (Schaden-assoziiertes molekulares Muster)</i>
DLQI	<i>Dermatologischer Lebensqualitäts-Index</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)</i>
EGF	<i>epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor (EGF-Rezeptor)</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum (Fetales Kälberserum)</i>
FCS	<i>Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)</i>
FLG	<i>Filaggrin</i>
GAP	<i>GTP-ase aktivierendes Protein</i>
GATA3	<i>Glutamyl Aminotransferase-Untereinheit A</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor)</i>
GDP	<i>Guanosindiphosphat</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)</i>
GRB10	<i>Growth factor receptor-bound protein 10</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
GTPase	<i>Guanosin-5-triphosphat-Protease</i>

GβL *G-protein β-subunit like protein*
 HaCaT *human adult low calcium temperature keratinocytes (Humane adulte Keratinozyten, niedriges Kalziummilieu, erhöhte Temperatur)*
 HbA1c *Hämoglobin A1c*
 HCL *Chlorwasserstoff*
 HE *Hämatoxylin-Eosin*
 HiSCR *Hidradenitis Suppurativa Clinical Response*
 HRP *Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)*
 HS *Hidradenitis suppurativa*
 HSSI *Hidradenitis Suppurativa Severity Index*
 IFN *Interferon*
 IGF-1R *Insulin-like growth factor 1 receptor (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1-Rezeptor)*
 IgG *Immunglobulin G*
 IHC *Immunhistochemie*
 IHS4 *International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System*
 IKKβ *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*
 IL *Interleukin*
 IRS *Insulinrezeptorsubstrat*
 IVL *Involucrin*
 JAK *Just another kinase (Januskinase)*
 JNK *c-Jun N-terminal protein kinase (c-Jun-N-terminale Kinase)*
 K10 *Cytokeratin 10*
 LCN2 *Lipocalin-2*
 LSD *Least Significant Difference (Kleinste gesicherte Differenz)*
 m *männlich*
 mAb *monoclonal antibody (Monoklonaler Antikörper)*
 MLST8 *mammalian LST8*
 MSS *modifizierter Sartorius Score*
 mTOR *Mammalian target of rapamycin*
 mTORC1 *mTOR complex 1*
 mTORC2 *mTOR complex 2*
 nAChR *nikotinerger Acetylcholinrezeptor*
 NaCl *Natriumchlorid*
 NaN₃ *Natriumazid*
 NF-κB *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*
 NGS *Normal Goat Serum (Normales Ziegen Serum)*
 NSAR *nichtsteroidale Antirheumatika*
 OP *Operation*
 P *Phospho*
 PAPASH *pyogene Arthritis, Pyoderma gangraenosum, Akne, suppurative Hidradenitis*

PASH *Pyoderma gangraenosum, Akne, suppurative Hidradenitis*
PBS *Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)*
PCR *Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)*
PDK1 *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (3-Phosphoinositid abhängige Proteinkinase 1)*
PGA *Physician's Global Assessment*
pH *potentia hydrogenii (Potential des Wasserstoffs)*
PI3-K *Phosphatidylinositol-3-Kinase*
PIP2 *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat*
PIP3 *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat*
PKB/Akt *Proteinkinase B*
PMSF *Phenylmethylsulfonylfluorid*
PPAR *Peroxisome proliferator-activated receptor (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor)*
PRAS40 *Proline-rich Akt substrate of 40 kDa*
PVDF *Polyvinylidendifluorid*
RAPTOR *regulatory associated protein of mTOR*
Ras *Rat sarcoma protein*
RIPA *Radioimmunoprecipitation Assay*
rpm *revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)*
RTK *Rezeptortyrosinkinase*
S *Serin*
S. aureus *Staphylococcus aureus*
S6 *ribosomales Protein S6*
S6K1 *S6-Kinase-1*
SAHS *Severity Assessment of Hidradenitis Suppurativa*
SDS *Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)*
SEM *standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)*
Ser *Serin*
SH2-Domäne *Src-homologe-Domäne-2-Protein*
SREBP *Sterol regulatory element-binding protein*
STAT *Signal Transducer and Activator of Transcription*
T *Threonin*
TBS *Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)*
TBS-T *Tris-buffered saline with Tween (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween)*
TCR *T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)*
TEMED *Tetramethylethylendiamin*
TH *T-Helfer-Lymphozyt*
TLR *Toll-like-Rezeptor*
TNF *Tumornekrosefaktor*
Tris *Tris(hydroxymethyl)aminomethan*

TSC1 *Tuberous sclerosis 1 (Hamartin)*

TSC2 *Tuberous sclerosis 2 (Tuberin)*

TYK2 *Tyrosinkinase 2*

Tyr *Tyrosin*

VE H₂O *vollentsalztes Wasser*

w *weiblich*

WB *Western Blot*

Y *Tyrosin*

YAG *Yttrium-Aluminium-Granat*

z.B. *zum Beispiel*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Hautaufbaus²	12
Abbildung 2: Klinische Merkmale der Acne inversa^{14,16}	15
Abbildung 3: Pathomechanismus der Acne inversa³¹	18
Abbildung 4: Angenommene Pathophysiologie der Acne inversa³⁴	21
Abbildung 5: Therapeutisches Management der Acne inversa³²	28
Abbildung 6: Histologische Merkmale der Psoriasis und Acne inversa ...	30
Abbildung 7: Der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg⁹¹	33
Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des JAK/STAT-Signalwegs¹⁰¹	34
Abbildung 9: Differenzielle mTOR-Aktivität an unterschiedlichen AI-Läsionsstellen	58
Abbildung 10: mTOR und S6 zeigen Hyperaktivierung in AI-Läsionen	60
Abbildung 11: Aberrante Differenzierung in AI-Läsionen	64
Abbildung 12: Acne inversa ist mit einer aberranten Expression der Differenzierungsmarker Filaggrin (FLG), Involucrin (IVL) und Cytokeratin 10 (K10) assoziiert	66
Abbildung 13: Massive Proliferation und starke Entzündung in den AI-Läsionen	72
Abbildung 14: Gesteigerte Proliferations- und Entzündungsrate in der Acne inversa	73
Abbildung 15: TNF-α, IL-1β und Mix (IL-1β, TNF-α, IL-17A) induzieren in HaCaT-Zellen die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 und die Phosphorylierung von STAT3 an S727 über den PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg	75
Abbildung 16: IL-22 induziert in HaCaT-Zellen die Phosphorylierung von STAT3 an Y705 über den JAK/STAT3-Signalweg. Rapamycin hemmt die zytokinvermittelte Phosphorylierung von mTOR, S6 und STAT3-S727	76
Abbildung 17: Erhöhte m-TOR- und STAT3-S727-Aktivität in den oberen Epidermisschichten in der AI	80
Abbildung 18: Erhöhte Aktivität von STAT3-Y705 und STAT3-S727 in der Acne inversa	81
Abbildung 19: Schema einer möglichen Deregulierung des mTOR/STAT3-Signalwegs in der AI	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Acne inversa-Patientenliste	38
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien	39
Tabelle 3: Übersicht zu den verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe der Bestellnummer und des Herstellers.....	39
Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Primärantikörper mit Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller	41
Tabelle 5: Übersicht der eingesetzten Sekundärantikörper mit Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller	43
Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Zytokine mit Artikelnummer und Hersteller.....	43
Tabelle 7: Übersicht der eingesetzten chemischen Inhibitoren mit Konzentration, Artikelnummer und Hersteller	43
Tabelle 8: Übersicht zu den verwendeten Materialien mit Angabe der Artikelnummer und des Herstellers	44
Tabelle 9: Übersicht der Lösungen und Puffer mit Zusammensetzung	44
Tabelle 10: Übersicht zu den verwendeten Geräten mit Angabe des Herstellers	46
Tabelle 11: Zellzahl zur Aussaat bei Versuchen	48
Tabelle 12: Pipettierschema für die Sammel- und Trenngele der SDS-Page	50
Tabelle 13: Verdünnung der Primärantikörper für den Western-Blot	51
Tabelle 14: Antikörperverdünnungen für die immunhistologische Färbungen.....	54

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von 1,4-2,0 m² das größte Organ des menschlichen Körpers. Neben dem Schutz vor äußeren Einflüssen (z.B. Krankheitserreger, Ultraviolettstrahlung) ist sie für die Sinneswahrnehmung und die Temperaturregulation verantwortlich.¹ Die Haut besteht aus drei Schichten: der Epidermis, der Dermis und der Subcutis (Abb. 1).

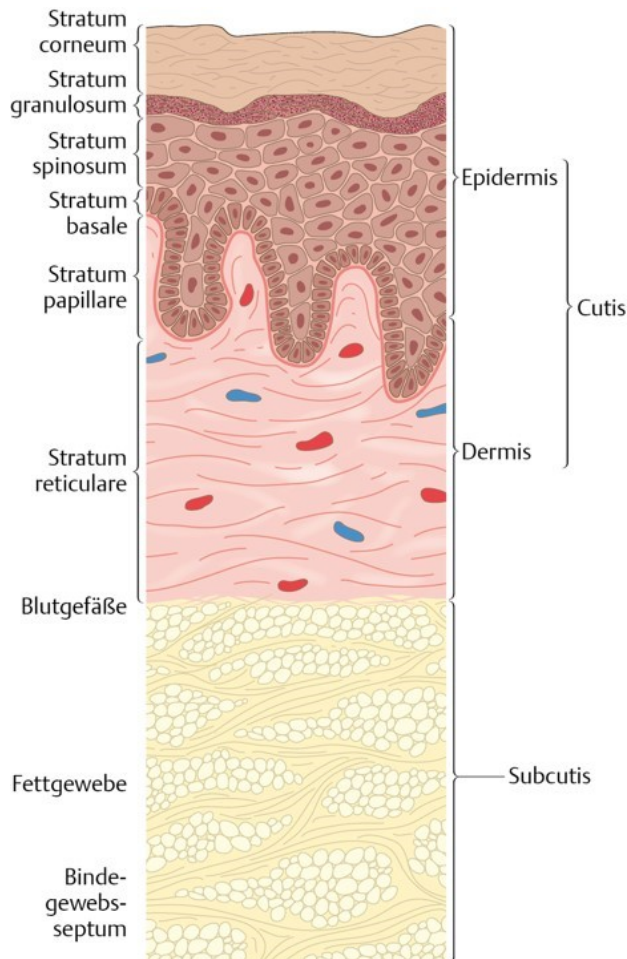


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Hautaufbaus²

Die Haut wird in folgende drei Schichten unterteilt: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut).

Die Epidermis ist ein gefäßfreies, mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel. Neben Keratinozyten gibt es noch weitere Zelltypen innerhalb der Epidermis: Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkel-Zellen. Die darunterliegende Dermis ist eine bindegewebige Schicht, welche der Haut durch ihre Struktur eine hohe Reißfestigkeit und Elastizität verleiht. Sie wird histologisch in zwei Schichten unterteilt (Stratum reticulare und Stratum papillare) und ist im

Gegensatz zur Epidermis gefäßreich. Die Dermis enthält Mechanorezeptoren (Meissner-Tastkörperchen, Ruffini-Körperchen) sowie zahlreiche freie Nervenendigungen, zu denen die Nozizeptoren und die Thermorezeptoren gehören. Die Subcutis besteht aus einem lockeren Binde- und Fettgewebe. Sie ermöglicht die Verschiebbarkeit zwischen Haut und Körperfaszie und enthält die Vater-Pacini-Körperchen, die der Vibrationsempfindung dienen. Das Fettgewebe fungiert außerdem als Wärmeisolator und Energiespeicher.³

Das mehrschichtige verhornende Plattenepithel der Epidermis hat ein großes Regenerationsvermögen. Die Neubildung der Epithelzellen erfolgt im Stratum germinativum, welches aus Stratum basale und Stratum spinosum besteht. Von hier gelangen die Keratinozyten an die Oberfläche, wobei es in den mittleren Epidermisschichten zur Verhornung kommt. Schließlich bilden sich oberflächlich Korneozyten, die von der Haut abgeschilfert werden.⁴ Das Stratum corneum bildet eine dichte Hautbarriere, welche einem Ziegelstein-Mörtel-Modell ähnelt: Dabei stellen die Hornzellen die »Ziegelsteine« und die interzellulären Lipide den »Mörtel« dar.⁵

Zur Aufrechterhaltung einer gesunden Epidermis muss ein exakt reguliertes Gleichgewicht zwischen Keratinozytenproliferation in der Basalschicht und apikaler, terminaler Differenzierung und Apoptose herrschen.³ Die Differenzierung beschreibt die strukturelle und funktionelle Entfaltung der Keratinozyten auf ihrem Weg vom Stratum basale, dem Ort der Proliferation, zum Stratum corneum. Auf diesem Weg werden die Zellorganellen abgebaut bis eine kernlose Hornschicht entsteht, außerdem werden von den Keratinozyten verschiedene Strukturproteine freigesetzt. Zu den bedeutendsten zählen Filaggrin, Involucrin und bestimmte Keratinfilamentproteine (wie z.B. Cytokeratin 10).⁶ Das Strukturprotein Filaggrin wird im terminalen Differenzierungsprozess aus Profilaggrin durch Dephosphorylierung gebildet und findet sich in gesunder Haut vor allem im Stratum granulosum.⁷ Involucrin ist ebenfalls ein Marker der späten Differenzierung, er wird von den Keratinozyten im oberen Stratum spinosum exprimiert und erreicht die maximale Ausprägung im Stratum granulosum. Cytokeratin 10 ist ein wichtiger Marker der frühen Differenzierung und findet sich bereits suprabasal in den tiefen Stratum spinosum-Schichten.⁸ Ein abweichendes Verhaltensmuster der Differenzierungsmarker kann somit wertvolle Hinweise zum Vorliegen einer Differenzierungsstörung in Dermatosen

liefern. Zusätzlich werden von den Keratinozyten während der epidermalen Differenzierung Lipide synthetisiert und in den Interzellularraum abgegeben, wo sie zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion Lipidschichten bilden. Eine gestörte Differenzierung, einschließlich Veränderungen der Lipidzusammensetzung, verursacht eine beeinträchtigte Barrierefunktion. Dies führt folglich zu einem verstärkten transepidermalen Wasserverlust und dem Eindringen von externen Pathogenen, was in einer trockenen Haut und der Anfälligkeit für kutane Infektionen resultiert.⁹

1.2 Hidradenitis suppurativa

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Die Hidradenitis suppurativa (HS), auch Acne inversa (AI) genannt, ist eine chronisch entzündliche, immunvermittelte Erkrankung der Terminalhaarfollikel, die an intertriginösen Bereichen der Körperoberfläche auftritt und Charakteristika einer Systemerkrankung aufweist. Am häufigsten manifestiert sich die Erkrankung in Form von sehr schmerzhaften, tiefsitzenden und entzündeten Hautläsionen in der Axilla, sowie der Inguinal- und Anogenitalregion.¹⁰ Erstmals wurde die AI im Jahre 1854 von einem französischen Chirurgen Aristide Verneuil beschrieben. Aufgrund der damaligen Annahme, dass es sich um eine mit Entzündung der apokrinen Schweißdrüsen einhergehende Erkrankung handele, erhielt sie 1865 die französische Bezeichnung „l'hydrosadénite phlegmoneuse“ – latinisiert „Hidradenitis suppurativa“ (Hidros = Schweiß, Aden = Drüse).¹¹ 1955 konnten Shelley und Cahn durch experimentelle Okklusion axillärer Haut bei gesunden Probanden zeigen, dass dies zu Acne inversa-artigen Läsionen führt. Die dabei durchgeführten histologischen Untersuchungen zeigten eine Okklusion der Haarfollikel durch Keratinpfropfe mit Beteiligung der Ausführungsgänge der apokrinen Drüsen. Die Hypothese wurde von Yu und Cook sowie Plewig und Kligman bestätigt.¹²

In der europäischen Allgemeinbevölkerung wird anhand mehrerer Studien eine Prävalenz von 1 % und bei jungen Frauen von 4 % geschätzt, während die epidemiologischen Daten aus Amerika von einer Prävalenz zwischen 0,05 % und 0,20 % berichten.¹³ Frauen sind 3 Mal häufiger betroffen als Männer,¹⁴ wobei die Leistengegend und die Axilla häufiger bei Frauen und das Gesäß und die

perianale Hautregion bei Männern befallen sind. In der Regel tritt die Erkrankung nach der Pubertät auf, das durchschnittliche Alter bei der Erstmanifestation der Acne inversa beträgt 22.1 Jahre (± 8.2).¹²

1.2.2 Klinik

Die Diagnose der Acne inversa wird hauptsächlich anhand klinischer Merkmale gestellt, dabei sind die typische Morphologie der Hautläsionen, das Verteilungsmuster und der rezidivierende chronische Krankheitsverlauf von Bedeutung. Der charakteristische Hautbefund der AI sind subkutane Knoten und Abszesse an intertriginösen Hautarealen wie in der Axilla, in der Leisten- und Anogenitalregion, perineal und inframammär, wobei auch aberrante Läsionen wie zum Beispiel periumbilikal oder thorakal auftreten können. Gluteale, perineale/perianale und atypische Bereiche (z.B. Ohren, Brust und Beine) sind vor allem bei den Männern und Leisten und inframammäre Hautregionen bei den Frauen befallen (Abb. 2).^{15,16} Bei etwa 90 % der Patienten sind mehr als eine Region betroffen.¹⁷



Abbildung 2: Klinische Merkmale der Acne inversa^{14,16}

(a) Anogenitale Acne inversa mit sekundärem Vulvaödem und Narbenbildung. (b) Tief sitzende Knötchen im Achselbereich. (c) Axilläre AI: Eiterung, Sinustrakt-Bildung und Narbenbildung. (d) Fisteln und Fibrose bei chronischer Acne inversa mit postinflammatorischer Hyperpigmentierung.

Etwa die Hälfte der Patienten berichtet über Prodromi wie Juckreiz, Schmerzen, Brennen, Stechen, Wärme oder Hyperhidrosis an der betroffenen Stelle. Die Knoten können sich entweder spontan zurückbilden, persistieren oder sich zu einem tiefen, schmerzhaften Hautabszess entwickeln. Dieser kann wiederum spontan rupturieren und sich entleeren, was eine übelriechende Sekretion zur Folge hat. Zu den anderen pathognomonischen Läsionen der AI gehören im Verlauf Fisteln, Sinustrakte und hypertrophe Narben.¹³ Neben lokalen Vernarbungen kann der Verlauf der AI in schweren Fällen von weiteren Komplikationen gekennzeichnet sein. Selten kommt es zum Auftreten von Weichteilinfektionen wie Erysipel oder Phlegmone mit septischen Verläufen.¹⁸ Der Schweregrad der AI wird im klinischen Alltag nach dem Hurley-Score eingeteilt,¹⁹ dies ist die am weitesten verbreitete Einteilung, die die Einstufung der Erkrankung in 3 Schweregrade (leicht, mittel und schwer; Hurley I bis III) erlaubt. Weitere Scoring-Systeme zur Bewertung des Schweregrades sind der modifizierte Sartorius Score (MSS), der HS-Physician's Global Assessment (HS-PGA), der Hidradenitis Suppurativa Severity Index (HSSI), der Acne Inversa Severity Index (AISI) und der International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System (IHS4-Score).^{20,21} Für wissenschaftliche Untersuchungen und dynamische Beurteilung der Schwere der AI stehen darüber hinaus weitere Scoring-Systeme wie z.B. der Severity Assessment of Hidradenitis Suppurativa (SAHS) oder der HS Clinical Response-Score (HiSCR) zur Verfügung.^{20,22}

1.2.2.1 Komorbiditäten

Die neusten Forschungen zeigen, dass AI eine Systemerkrankung darstellt. Durch den chronischen Verlauf der Erkrankung mit rezidivierenden Schüben, verbunden mit starken Schmerzen und übelriechenden Sekretionen, kommt es zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität.²³ Neben sekundären psychischen Störungen wie Depressionen, Angstzuständen, Schizophrenie und erhöhtem Suizidrisiko bestehen Assoziationen zwischen AI und Erkrankungen weiterer Formenkreise. Zu den extradermalen Manifestationen zählen chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), Spondyloarthropathien und die rheumatoide Arthritis. Außer chronisch entzündlicher Erkrankungen ist die AI mit dem metabolischen Syndrom und kardiovaskulären Begleiterkrankungen

vergesellschaftet und ist ein Bestandteil unterschiedlicher Autoimmun-Syndrome wie PASH (Pyoderma gangraenosum, Akne, suppurative Hidradenitis) und PAPASH (pyogene Arthritis, Pyoderma gangraenosum, Akne, suppurative Hidradenitis).²⁴

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese

1.2.3.1 Pathomechanismus

Die Pathogenese der Acne inversa ist weitgehend ungeklärt. Heute geht man nicht mehr wie früher davon aus, dass der Ursprung der Erkrankung in den apokrinen Schweißdrüsen liegt. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass es sich bei der AI um eine Erkrankung mit gestörter Immunreaktion im Bereich der Terminalhaarfollikel an intertriginösen Hautarealen handelt. Neben der perifollikulären Entzündung zählen eine genetische Prädisposition, Rauchen, Adipositas, bakterielle Besiedlung - insbesondere mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) - , sowie Diabetes mellitus/Insulinresistenz und Dyslipidämie zu den Triggerfaktoren der Acne inversa.^{25,26} Einige Autoren vermuten dennoch, dass die apokrinen Drüsen ebenfalls eine Rolle bei der Manifestation der AI spielen, indem durch die Sekretion einer bisher noch unbekannt Substanz ein Effekt auf den distalen Abschnitt des Infundibulums erzeugt wird.²⁷ Eine Arbeit von Kamp *et al.* stellte einen reduzierten Anteil von Talgdrüsen in Follikelbiopsien läsionaler Haut von AI-Patienten fest. Die Autoren vermuten dabei eine Obliteration der Talgdrüsen während der Entwicklung der AI-Läsionen.²⁸

Die follikuläre Hyperkeratose mit Verschluss des oberen Haarfollikelanteils scheint das initiale Ereignis der AI zu sein (Abb. 3 (1)). Durch die Okklusion des Haarfollikels kommt es zu einer Retention seines Inhalts und anschließend zu dessen Dilatation. Schließlich kommt es zu einer Ruptur und einer Entleerung des Follikelinhalts (Talg, Ablagerungen, Keratin und Bakterien) in die umgebende Dermis, was wiederum eine Entzündungsreaktion mit Ausbildung schmerzhafter Hautläsionen auslöst (Abb. 3 (2)). Bei Fortbestehen der Entzündung können sich anschließend Fisteln ausbilden, die ein günstiges Milieu für eine Besiedlung mit Bakterien schaffen (Abb. 3 (3)).^{14,29,30}

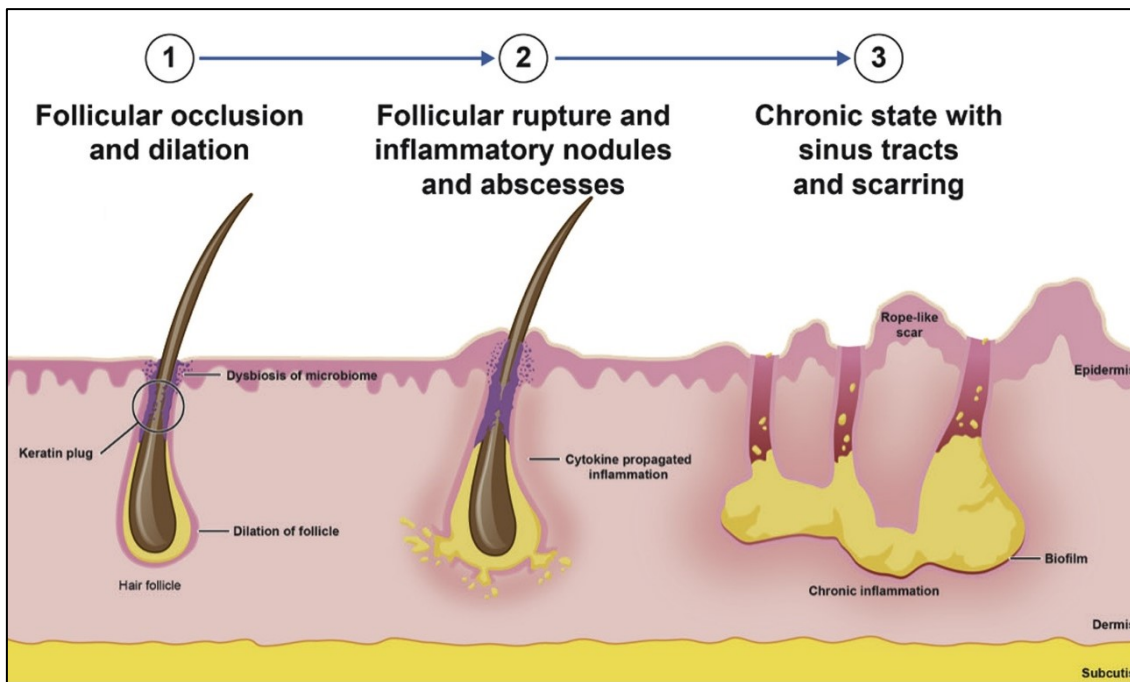


Abbildung 3: Pathomechanismus der Acne inversa³¹

(1) Follikuläre Hyperkeratinisierung mit Okklusion und Dilatation des Haarfollikels. (2) Ruptur und Entleerung des Follikelinhalts in die Dermis lösen eine Entzündungsreaktion aus. (3) Chronifizierung und Ausbildung von Fistelgängen.

1.2.3.2 Immundysregulation und Entzündung

Eine Immundysregulation im Bereich der Terminalhaarfollikel ist pathophysiologisch für die Entstehung der AI verantwortlich (Abb. 4). Durch die follikuläre Okklusion und die daraus resultierte Stase des Follikelinhalts können Bakterienbestandteile und Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) lokale Makrophagen und dendritische Zellen aktivieren und diese zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine, unter anderem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β), anregen. TNF- α und IL-1 β induzieren die Produktion von Chemokinen, was mittels Chemotaxis neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten rekrutiert, was in einer Entzündungsreaktion mit Ausbildung von AI-Läsionen resultiert. Makrophagen und dendritische Zellen, T-Zellen und neutrophile Granulozyten sind die am häufigsten vorkommenden Zellen in AI-Läsionen. Zusätzlich finden sich in den Läsionen Mastzellen, natürliche Killerzellen, B-Zellen und Plasmazellen. Ihre Bedeutung in der AI-Pathogenese ist jedoch bis jetzt nicht vollständig geklärt.^{13,32} Die eingewanderten neutrophilen Granulozyten produzieren Mediatoren wie Lipocalin-2 (LCN2), welches zur Auslösung des Entzündungsschmerzes und zu einer vermehrten

Infiltration der Neutrophilen und somit einer Chronifizierung des Geschehens führt.^{33,34} TNF- α aktiviert zusätzlich das Endothel, was eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen zur Folge hat. Zusammen führen Chemotaxis und Endothelzellaktivierung zu einer Immunezellinfiltration, die in einem verstärkten Entzündungsprozess resultiert.³² Neben TNF- α und IL-1 β zeigen sich in den AI-Läsionen auch hohe Spiegel von Interferon- γ (IFN γ) und IL-17, welche von T-Zellen sezerniert werden.³⁵ Das aus den Typ1-T-Helferzellen (TH1-Lymphozyten) stammende IFN γ ist einerseits für die Sekretion von Chemokinen, welche die TH1-Zellen anlocken, zuständig, andererseits aktiviert es wie TNF- α das Endothel und führt damit zu einer verstärkten Immunezellinfiltration. Die durch IFN γ vermittelte Aktivierung von Makrophagen sorgt für eine Antigenpräsentation und folglich für eine T-Zell-Aktivierung.³⁶ IL-17, welches überwiegend von TH17-Zellen produziert wird, triggert die Sekretion von Chemokinen, Zytokinen (IL-19 und Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF)) und antimikrobiellen Peptiden.^{32,37} Die Zytokine IL-12 und IL-23, welche hauptsächlich von dendritischen Zellen und Makrophagen produziert werden, können ebenfalls in AI-Läsionen nachgewiesen werden. Diese üben einen wichtigen Einfluss auf die Funktion von TH1- und TH17-Zellen aus.^{38,39} Darüber hinaus können nicht nur Zytokine, sondern auch die aus dem Fettgewebe freigesetzten Adipokine die Entzündung unterhalten.⁴⁰

Neben den proinflammatorischen Zytokinen wird in den AI-Läsionen auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 exprimiert. Dieses scheint wiederum die IL-22-Produktion zu hemmen.³⁹ Da IL-22 die Expression von IL-20 induziert, wird auch dessen Produktion in der Acne inversa beeinträchtigt. Infolgedessen ist die IL-22/IL-20-Defizienz mit einer geringeren Expression antimikrobieller Peptide (AMPs) in der Epidermis verbunden und begünstigt somit durch die ständige bakterielle Präsenz einen chronischen Entzündungsprozess.⁴¹ IL-22-Mangel trägt außerdem zur Gewebsschädigung und zu den systemischen Stoffwechselveränderungen in der AI bei, da das Zytokin unter normalen Bedingungen die Triglyceridsynthese in der Leber drosselt, die Insulinsensitivität verbessert und die Glukoseaufnahme im plurivakuolären Fettgewebe erhöht.^{42,43} Für das Fortschreiten der Erkrankung und die Ruptur des dilatierten Haarfollikels sind hauptsächlich die intrafollikuläre Bakterienvermehrung und die massive Immunezellinfiltration verantwortlich. Der freigesetzte Follikelinhalt setzt die

Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in Gange, die wie oben erwähnt, durch verschiedene Prozesse zur Ausbildung von AI-Läsionen führen.

Melnik und Plewig stufen die AI als eine Autoimmunerkrankung ein, die durch eine Dysregulation der Gamma-Sekretase/ des Notch-Signalwegs gekennzeichnet ist.⁴⁴ Mutationen des Signalwegs führen zur Umwandlung der Haarfollikel in keratinreiche epidermale Zysten, zur Beeinträchtigung der Homöostase apokriner Drüsen und zur Toll-like-Rezeptor (TLR) vermittelten Stimulation des angeborenen Immunsystems, durch welche die chronische Entzündung aufrechterhalten wird. Bei der Ruptur epidermaler Zysten können freiliegende Keratinbestandteile die TLRs auf Makrophagen und dendritischen Zellen aktivieren. Makrophagen und dendritische Zellen werden wiederum zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine, unter anderem TNF- α und IL-1 β , angeregt. Die Zytokinfreisetzung fördert die TH17-Zellpolarisation und steigert demnach die Immunantwort.^{13,44}

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die komplexe AI-Pathogenese Eigenschaften einer neutrophilen und entzündlichen Dermatose aufzeigt, bei welcher die bakterielle Präsenz zum Entzündungsprozess beiträgt. Viele Ergebnisse legen nahe, dass vor allem der IL-1 β /IL-23/TH17/IL-17-Signalweg in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielen könnte.^{32,45-47}

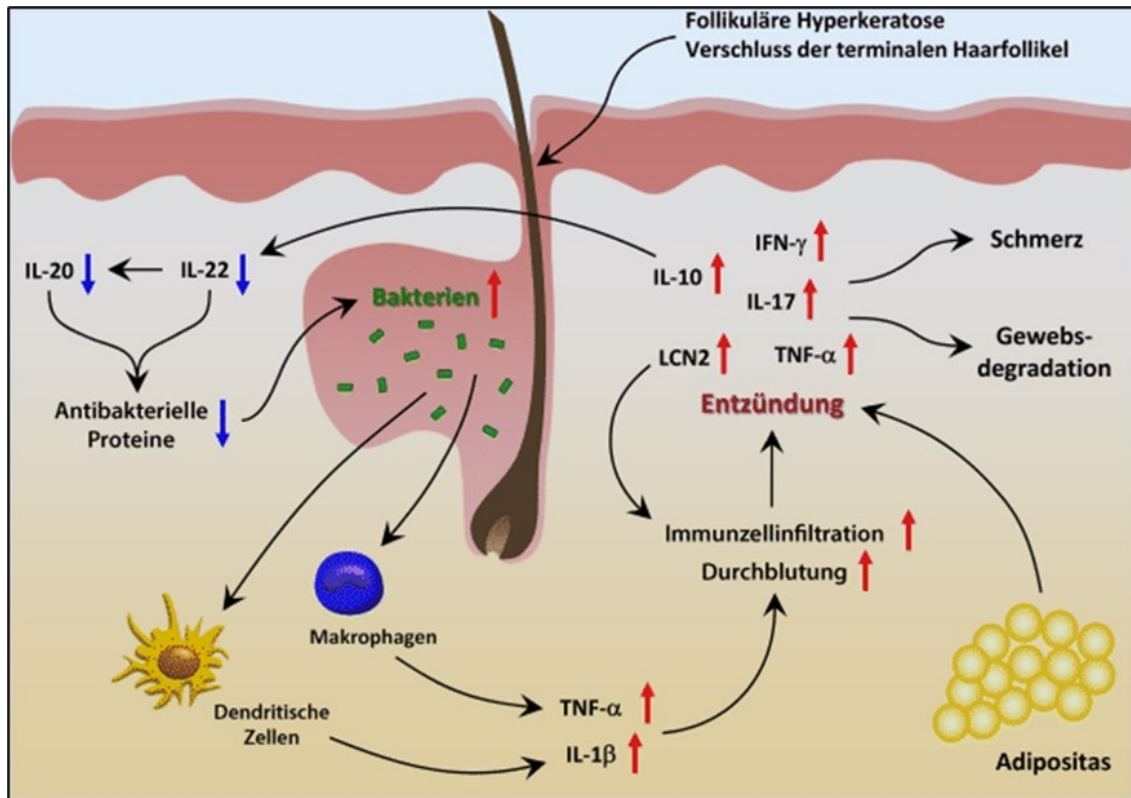


Abbildung 4: Angenommene Pathophysiologie der Acne inversa³⁴

Lokale Zellschädigungen an den intertriginösen Hautarealen, hervorgerufen durch mechanische Reibung, führen zur Freisetzung von DAMPs und zum Eindringen bakterieller Bestandteile in die Haut. Beides regt die lokalen Immunzellen zur Produktion von Chemokinen und Zytokinen an und führt zu einer perivaskulären und perifollikulären Immunzellinfiltration. Die Hochregulation proinflammatorischer Zytokine wird zusätzlich durch die Entzündung des subkutanen Fettgewebes adipöser Patienten gesteigert. Mediatoren der perifollikulären Immunzellen induzieren im Folgenden eine Hyperplasie und Hyperkeratose des infundibulären Epithels, was zu einem Follikelverschluss führt. Folglich kommt es zu einer intrafollikulären Stase mit Dilatation des Haarfollikels. Der Haarfollikelinhalt triggert das angeborene Immunsystem und die Produktion von TNF- α und IL-1 β , welche das Endothel aktivieren und die Chemokinproduktion induzieren. Zusammen verstärken diese Signale die weitere Immunzellinfiltration in das Gewebe. Die von den dendritischen Zellen produzierten IL-12 und IL-23 üben einen wichtigen Einfluss auf die TH1- und TH17-Zellen aus, indem sie diese bei der Produktion von IL-17 und IFN γ unterstützen. IL-10, welches überwiegend von Makrophagen freigesetzt wird, hemmt die Produktion von IL-17 und IFN γ . Der IL-22-Mangel führt zu unzureichenden Mengen an antimikrobiellen Proteinen, was durch die ständige bakterielle Präsenz einen chronischen Entzündungsprozess verstärkt. Die intrafollikuläre Dilatation führt zur Ruptur und Freisetzung des immunstimulierenden Follikelinhalts. Eine massive Granulozyteninfiltration, die durch LCN2 aufrechterhalten wird, führt zur Eiterbildung. Mediatoren von aktivierten T-Zellen und Keratinozyten tragen zur epithelialen Hyperplasie bei, die sich auch in den interfollikulären Bereichen entwickelt. Die Gewebsdegradation und die Eiteransammlung führen schließlich zur Fistelbildung.³²

1.2.3.3 Triggerfaktoren der Acne inversa

Nach aktuellen Forschungsergebnissen wird angenommen, dass Acne inversa eine multifaktoriell bedingte Erkrankung darstellt, der eine individuelle Veranlagung zugrunde liegt. Im Folgenden werden anerkannte Triggerfaktoren, die mit der AI in Verbindung gebracht werden, näher erläutert.

1.2.3.3.1 Rauchen und Adipositas

Rauchen stellt einen der wichtigsten Triggerfaktoren der Acne inversa dar, mehr als 70 % der AI-Patienten sind Raucher.¹⁴ Folgende Mechanismen werden in Bezug auf den Zusammenhang zwischen AI und Nikotinkonsum vermutet: Zum einen induziert das Rauchen eine epidermale Hyperplasie und Keratinisierung, was in einer follikulären Okklusion resultiert. Hana *et al.* vermuten, dass das nicht-neuronale cholinerge System eine epidermale infundibuläre Hyperplasie und damit die Follikelokklusion in der AI provoziert.⁴⁸ Außerdem ist bekannt, dass Rauchen durch Freisetzung verschiedener Mediatoren eine aberrante Aktivierung des Epidermal Growth Factor-Rezeptors (EGF-Rezeptor) induziert und somit eine Epithelzellhyperplasie und eine Schleimhautzellmetaplasie verursacht.⁴⁹ Andererseits beeinflusst es negativ das Immunsystem der Haut, führt zu einer Erhöhung der mikrobiellen Virulenz und zu einem Mangel an antimikrobiellen Peptiden.^{15,50} Nikotin kann außerdem in hohen Konzentrationen im Achselschweiß eine Woche nach dem Rauchen nachgewiesen werden und fördert das Wachstum von *S. aureus in vitro*. Klinisch konnte dies durch den verstärkten Nachweis von *S. aureus* bei Rauchern und bei AI-Patienten bestätigt werden. *S. aureus* stimuliert wiederum die endogene Acetylcholin-Produktion, Acetylcholin seinerseits induziert zusammen mit Nikotin durch eine direkte toxische Wirkung über den nikotinergeren Acetylcholinrezeptor (nAChR) höchstwahrscheinlich eine epidermale Hyperplasie.¹⁸

Mehrere Studien zeigen eine signifikant höhere Prävalenz des metabolischen Syndroms bei AI-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Probanden, die nicht an AI erkrankt sind). Zusätzlich wird eine zweifach höhere Prävalenz des metabolischen Syndroms bei rauchenden AI-Patienten im Vergleich zu rauchenden Kontrollteilnehmern beobachtet.^{51,52} Durch Gewichtsreduktion kann eine Verbesserung der Schwere des Hautbefundes erreicht werden.⁵³

1.2.3.3.2 Genetische Prädisposition

Bis zu 40 % der betroffenen Patienten weisen eine positive Familienanamnese auf, was auf eine genetische Prädisposition hindeutet. Selten findet man ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster.⁵⁴ Genetische Mutationen in Gamma-Sekretase-Genen wurden bei einer Minderheit der Patienten mit AI identifiziert.⁵⁵ Die Gamma-Sekretase katalysiert die intramembrane Spaltung von Membranproteinen, einschließlich des Notch-Rezeptors. In der Haut spielt der Notch-Signalweg eine Rolle in der Proliferation und Differenzierung der Epidermis und Haarfollikel. Tierstudien zeigen, dass eine gestörte Funktion der Gamma-Sekretase histopathologisch zu follikulären und epidermalen Fehlbildungen führt, die mit denen einer follikulären AI-Zyste vergleichbar sind.²⁵ Die Ergebnisse einer niederländischen Zwillingsstudie deuten darauf hin, dass der Beitrag genetischer Faktoren zur AI-Prädisposition in der Allgemeinbevölkerung stärker ist als bisher angenommen. Den Studienergebnissen zufolge beträgt die berechnete Heritabilität von Hidradenitis suppurativa, was der Vererbbarkeit der Erkrankung entspricht, 77 %. Diese scheint sogar höher zu sein als bei anderen Erkrankungen mit bekannter genetischer Komponente, wie zum Beispiel bei Psoriasis vulgaris, bei der die Heritabilität schätzungsweise bei 68 % liegt. Die Konkordanzrate in Bezug auf das Auftreten von AI-Läsionen war bei eineiigen im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen höher. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den betroffenen und nicht betroffenen Geschwistern der diskordanten Zwillingspaare hinsichtlich des BMIs und des Raucherstatus, was darauf hindeutet, dass neben den kausalen Triggerfaktoren wie Rauchen und Adipositas, die genetische Komponente bei der Krankheitsentstehung eine Rolle spielt.⁵⁶

1.2.3.3.3 Bakterien

Zwar konnte in den AI-Läsionen eine Besiedlung mit *S. aureus* nachgewiesen werden, eine bakterielle Infektion wird jedoch eher weniger als Hauptursache der AI angesehen. Die Bakterienkulturen aus AI-Läsionen sind überwiegend steril oder weisen nur Mikroorganismen der gesunden Hautflora nach.¹⁴ Es wurden verschiedene Bakterienarten aus AI-Läsionen und nicht-läsionaler Haut isoliert, dabei konnte jedoch ein unterschiedliches Verhältnis von anaeroben zu aeroben

Arten in läsionalen und nicht-läsionalen Hautarealen festgestellt werden, was wiederum darauf hindeutet, dass eine Veränderung des Hautmikrobioms eine Rolle bei der Entstehung der AI spielen könnte.⁵⁷ Eine gestörte Immunantwort gegen Bakterien könnte ebenfalls zum Krankheitsprozess beitragen. Hunger *et al.* beschreiben eine verstärkte Expression des Toll-like-Rezeptors 2 durch infiltrierende Makrophagen und dendritische Zellen in AI-Läsionen. Außerdem berichten die Autoren über eine zusätzliche Überexpression von C-Typ-Lektin-Rezeptoren, die bei der angeborenen Immunabwehr eine Rolle spielen, an der Phagozytose beteiligt sind und Bakterien binden. Eine durch Bakterien getriggerte verstärkte Expression könnte zur Pathogenese beitragen.^{58,59} Des Weiteren zeigen die Acne inversa-Läsionen einen Mangel an Expression von AMPs, welcher mit einer IL-22/IL-20-Defizienz korreliert. Beispiele für AMPs sind β -Defensin 1 (BD1), BD2, BD3 und die S100-Proteine S100A7 (bekannt als Psoriasin), S100A8 (Calgranulin A) und S100A9 (Calgranulin B). AMPs werden von den Keratinozyten produziert und spielen eine wichtige Rolle bei der kutanen Abwehr von Bakterien. Somit prädisponiert eine verminderte Konzentration antimikrobieller Peptide die Patienten für häufige Hautinfektionen und kann durch die ständige bakterielle Präsenz einen chronischen Entzündungsprozess verstärken.^{39,60}

1.2.4 Therapieoptionen

Die drei großen Therapiesäulen der Acne inversa umfassen Basismaßnahmen wie Lifestyle-Änderung, topische und systemische Behandlungen und chirurgische Intervention und Lasertherapie (Abb. 5).⁴⁷ Oftmals müssen mehrere Therapieansätze kombiniert werden, um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen. Die Wahl der Behandlung richtet sich dabei nach dem Verteilungsmuster und der Schwere der Erkrankung (z.B. Schweregrad nach Hurley), der anatomischen Lage und der entzündlichen Aktivität der Läsionen, den Komorbiditäten sowie den Behandlungskosten und der Verfügbarkeit.

Da Nikotinkonsum und Adipositas zu den Triggerfaktoren der Erkrankung zählen, ist bei jedem Patienten unabhängig vom Schweregrad der AI eine absolute Nikotinabstinenz und eine Gewichtsreduktion anzustreben. Es sollte locker sitzende Kleidung getragen werden, um Reibungen und eine mechanische

Reizung zu verhindern.⁶¹ Zink besitzt entzündungshemmende und antioxidative Eigenschaften und konnte bei Patienten mit Hurley-Stadium I und II erfolgreich eingesetzt werden.⁶² Schmerz ist ein häufiges Symptom, welches die Lebensqualität stark beeinträchtigt und komorbide Depressionen können die Schmerzwahrnehmung bei AI-Patienten zusätzlich verstärken. Studien berichten über ein gutes Schmerzmanagement mithilfe lokaler Analgetika, Paracetamol, nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR), Antiepileptika wie Pregabalin und Gabapentin und Antidepressiva (Venlafaxin, Duloxetin). Bei ungenügender Schmerzkontrolle muss in seltenen Fällen auf Opioidanalgetika zurückgegriffen werden.⁶³

Die topische Behandlung der Acne inversa umfasst antiseptische Waschmittel (z.B. Triclosan), Keratolytika und topische Antibiotika. Es können zur kurzfristigen Kontrolle intraläsional Kortikosteroide injiziert werden (z. B. Triamcinolon 3–5 mg).⁶⁴ Im Hurley-Stadium I und II kann Clindamycin 1 % topisch eingesetzt werden.^{65,66} Als Alternative können Tetrazykline wie z.B. Doxycyclin systemisch gegeben werden. In einer randomisierten kontrollierten Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Behandlungen (Clindamycin topisch vs. Tetrazyklin systemisch) festgestellt werden.⁶⁷ Bei einem höheren Schweregrad oder häufigen Exazerbationen sollten Antibiotika systemisch verabreicht werden. Die orale Kombination aus Clindamycin und Rifampicin über 10 bis 12 Wochen kann als Zweitlinientherapie für leichte bis mittelschwere AI oder als Erstlinientherapie bei schwerer Erkrankung (Hurley II-III) eingesetzt werden, in mehreren Studien konnte neben Reduktion von Schmerzen und Läsionen auch eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität unter der Zweifachtherapie gezeigt werden.⁶⁸⁻⁷⁰ Bei Therapieversagen besteht alternativ die Option einer Dreifachkombination aus Rifampicin, Moxifloxacin und Metronidazol.⁶⁶ Mit seiner antibakteriellen und entzündungshemmenden Wirkung kann Dapson als eine mögliche Erhaltungstherapie in Erwägung gezogen werden.⁷¹ Obwohl die AI nicht als eine Erkrankung infektiöser Ätiologie angesehen wird,⁷² nehmen Antibiotika einen festen Bestandteil im Therapiealgorithmus ein und verschiedene Studien legen ihre Wirksamkeit in der Behandlung der AI nahe. Die bakterielle Superinfektion in der Acne inversa scheint, obwohl sie nicht der direkte Krankheitsauslöser ist, eine der Hauptursachen für den inflammatorischen Circulus vitiosus zu sein.⁷³ Die

Antibiotika werden nicht nur wegen ihrer antibakteriellen Wirkung eingesetzt, um eine Superinfektion zu vermeiden, viel mehr stehen ihre anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Wirkkomponenten im Vordergrund.⁷⁴ So zeigte Clindamycin zum Beispiel, neben Reduktion bakterieller Virulenzfaktoren, Einfluss auf die nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells- (NF- κ B) und Aktivator-Protein-1 (AP-1) - Genexpression und eine Wirkung auf die Makrophagenfunktion *in vitro*. NF- κ B und das AP-1 sind wichtige Transkriptionsfaktoren, die die Expression vieler an der Entzündung beteiligter Gene regulieren.⁷⁵ Tetrazykline haben einen inhibitorischen Effekt auf proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-8 und Rifampicin reduziert die NF- κ B-Aktivität und hemmt die TH17-Differenzierung.⁷²

Weitere Möglichkeiten systemischer Therapie umfassen eine kurz- oder langfristige Kortikosteroidgabe. Da ein hormoneller Einfluss auf die Erkrankung beschrieben wurde, wird von einzelnen Autoren bei weiblichen Patienten eine orale antiandrogene Therapie mit Cyproteronacetat, Spironolacton und Finasterid empfohlen. Retinoide wie Acitretin oder Isotretinoin wurden ebenfalls mit Erfolg in der Behandlung der AI eingesetzt, daneben kann auch auf Cyclosporin A als Reservemittel zurückgegriffen werden.⁴⁷

Mehrere Studien haben erhöhte Spiegel an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in den AI-Läsionen nachgewiesen, aus diesem Grund stellt z.B. das Targeting von TNF- α und IL-1 β eine weitere Möglichkeit dar. Der anti-TNF- α -Antikörper Adalimumab, der aktuell einzige zugelassene Wirkstoff zur Behandlung der AI,³⁴ wird dabei als Erstlinientherapie bei mittelschwerer bis schwerer Acne inversa empfohlen, gefolgt von Infliximab (anti-TNF- α) und Anakinra (IL-1-Rezeptor-Antagonist) als Zweit- bzw. Drittlinientherapie (Off-label).⁶⁶ Die Ergebnisse einer randomisierten kontrollierten Phase III Studie mit insgesamt 633 Patienten spiegeln den positiven Effekt von Adalimumab wider: Bereits in den ersten 2 Wochen konnte im Vergleich zur Placebogruppe bei mehr als 40 % der mit Adalimumab Behandelten der Hidradenitis Suppurativa Clinical Response erreicht werden, der als eine mindestens 50 %ige Reduktion der entzündeten Läsionen definiert ist. Unter Adalimumab konnte nicht nur der Schweregrad der Erkrankung reduziert werden, sondern auch die Lebensqualität und die Schmerzsymptomatik verbessert werden.⁷⁶ Der Einsatz von Infliximab zeigte ebenfalls sehr gute Ergebnisse in einer deutlich kleineren Studie (n=38).⁷⁷

Der Effekt der TNF- α -Blocker ist jedoch nicht dauerhaft und Rezidive nach Absetzen der Therapie sind zu erwarten, während besonders bei Langzeitbehandlung mit Infliximab mit signifikanter Toxizität gerechnet werden muss.⁷⁸⁻⁸⁰ Neue Studien zeigen außerdem positive und vielversprechende Effekte anderer Biologika wie Secukinumab, einem Anti-IL-17A-Antikörper, und Ustekinumab, einem Anti-IL-12- und Anti-IL-23-Antikörper.^{81,82}

Bei Patienten mit schwer ausgeprägten chronischen Läsionen, die weder auf eine antibiotische noch auf eine anti-inflammatorische Therapie ansprechen, sollte eine chirurgische Intervention erwogen werden. Auch bei irreversiblen Läsionen wie Fistelgängen, Sinustrakten, Vernarbungen und Kontrakturen sollte ein chirurgischer Eingriff in Betracht gezogen werden. Eine weitere gewebsschonende Methode ist die Ablation der AI-Läsionen mittels eines Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Lasers, diese kann vor allem bei weit ausgedehnten Läsionen erfolgen. Die Anwendung des Yttrium-Aluminium-Granat (YAG)-Lasers stellt eine zusätzliche Möglichkeit dar. Sie zielt auf die Zerstörung von Haarfollikeln, dem Ursprungsort der Erkrankung und konnte in einer Studie positive Ergebnisse erzielen.^{47,83}

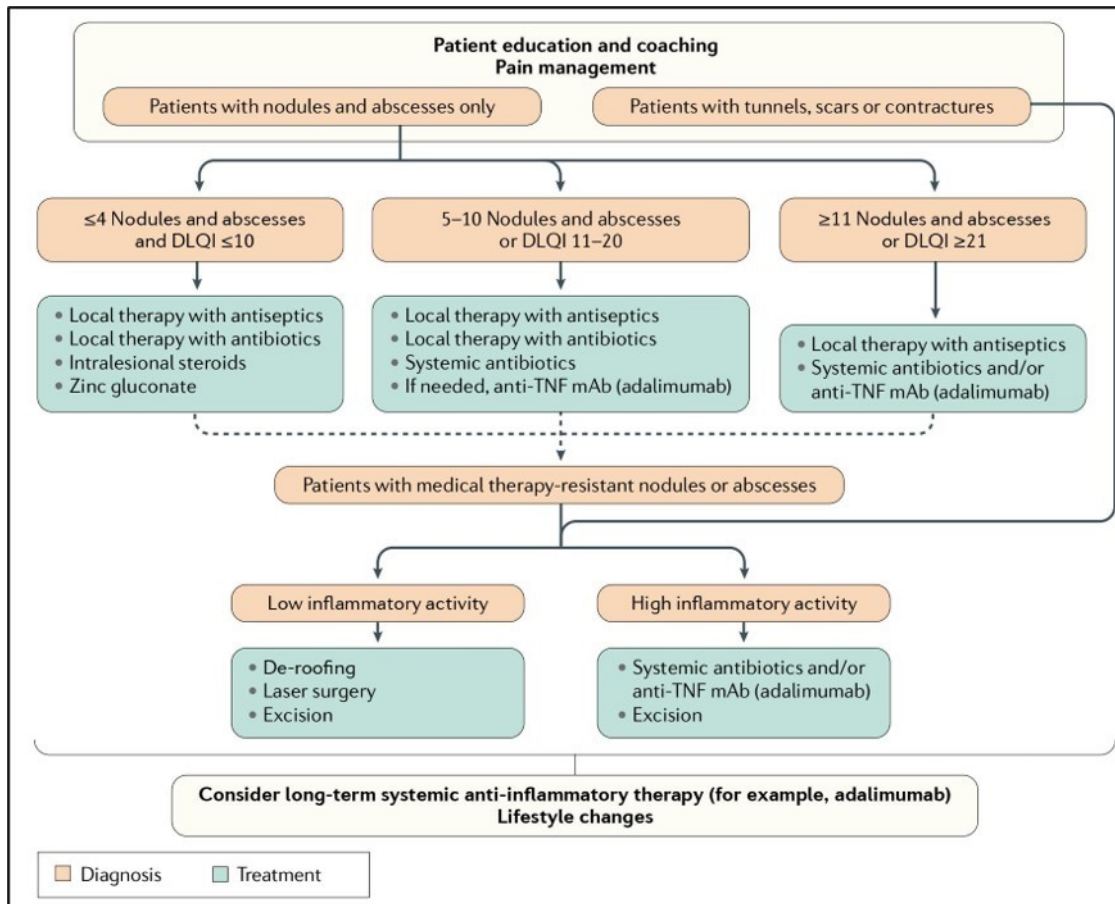


Abbildung 5: Therapeutisches Management der Acne inversa³²

Eine ausführliche Patientenaufklärung sollte die Basis der Therapie darstellen. Die Patienten mit Knoten und Abszessen sollten basierend auf der Anzahl der Läsionen und der Lebensqualität (Dermatologischer Lebensqualitäts-Index (DLQI)) in drei Untergruppen eingeteilt und mit Antibiotika und/oder anti-inflammatorischen Substanzen behandelt werden. Besteht eine Operationsindikation (z.B. bei Nichtansprechen auf die medikamentöse Behandlung oder bei Vorhandensein von Fistelgängen, Vernarbungen und Kontrakturen), sollten die Patienten mit einer geringen Entzündungsaktivität umgehend operiert werden. Patienten mit hoher Entzündungsaktivität sollten vor der Operation mit systemischen Antibiotika und/oder Adalimumab vorbehandelt werden. Abhängig vom Schweregrad der AI, sollte bei einigen Patienten eine langfristige systemische Therapie in Betracht gezogen werden. Unabhängig vom Schweregrad der Erkrankung ist bei jedem Patienten ein gesunder Lebensstil (Gewichtsreduktion, Rauchabstinenz) anzustreben.

1.3 Gemeinsamkeiten der Psoriasis vulgaris und Hidradenitis suppurativa

Sowohl bei der Psoriasis vulgaris als auch bei der Hidradenitis suppurativa handelt es sich um eine chronisch entzündliche Hauterkrankung. Obwohl beide Erkrankungen sich klinisch voneinander unterscheiden, weisen sie in immunologischer Hinsicht viele Gemeinsamkeiten auf. Im Zentrum der Pathogenese der Psoriasis vulgaris stehen die Entzündungsmediatoren von

TH17- sowie TH22-Zellen. IL-23 ist einer der wichtigsten Zytokine, welches die IL-22- und IL-17-Expression durch diese Immunzellen fördert. Außerdem können TNF- α , der hauptsächlich von TH17-Zellen, TH22-Zellen und Makrophagen exprimiert wird, sowie der TH1-Zellmediator IFN γ in Psoriasis-Läsionen nachgewiesen werden.³⁸

Mehrere Studien zeigen erhöhte Spiegel an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IFN γ , IL-1 β , IL-17 und IL-10 in Hautläsionen von AI-Patienten. Viele Ergebnisse legen nahe, dass vor allem auch hier der IL-23/TH17-Signalweg hyperaktiviert ist und in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielt.³²

Ebenfalls stimmen zahlreiche Risikofaktoren bei der Psoriasis und der Acne inversa überein, dazu gehören vor allem das Rauchen, Adipositas, mechanische Reizung und die genetische Prädisposition.^{14,84} Auch Komorbiditäten wie psychiatrische Erkrankungen, rheumatoide Arthritis oder CED können beide Dermatosen betreffen.⁸⁵

Doch die beiden Erkrankungen ähneln sich nicht nur in immunologischer Hinsicht. Auch histologisch haben sie viel gemeinsam (Abb. 6). Zu den typischen histologischen Merkmalen der Psoriasis vulgaris (Abb. 6b) gehören die Para- und Hyperkeratose, die aufgrund der gestörten Differenzierung und der gesteigerten Keratinozytenproliferation zustande kommen. Außerdem typisch sind eine Akanthose mit einem breiten Stratum spinosum und länglichen Reteleisten, die in die darunterliegende Dermis hineinragen. Auffällig in der Dermis sind die aufgetriebenen Papillarkörper und die lymphozytären Infiltrate.⁸⁶ Die Acne inversa ist histologisch ebenfalls durch ein psoriasiformes Bild gekennzeichnet (Abb. 6c). In den AI-Präparaten sind wie in der Psoriasis subepidermale entzündliche Infiltrate nachweisbar. Außerdem lässt sich eine Epidermishyperplasie mit psoriasiformen Reteleisten beobachten. Im Vergleich zur AI besteht das Stratum corneum in der Psoriasis vulgaris dagegen aus deutlich mehr Zellschichten, was der Psoriasis ihr typisches morphologisches Erscheinungsbild verleiht.

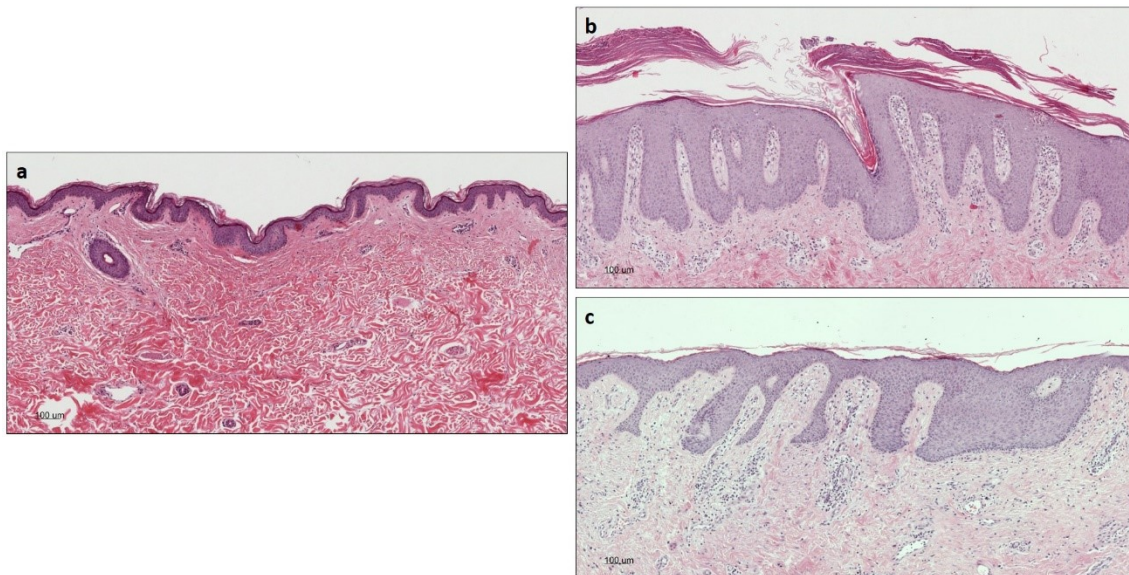


Abbildung 6: Histologische Merkmale der Psoriasis und Acne inversa

(a) Gesunde Haut, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). (b) Psoriasis vulgaris-Plaques, HE-Färbung. Epidermishyperplasie mit verlängerten Reteleisten, Hyperkeratose und konfluierende Parakeratose. (c) Acne inversa (Knoten), HE-Färbung. Epidermale psoriasiforme Hyperplasie mit einem subepidermalen entzündlichen Infiltrat.

Während bei der Psoriasis vulgaris heute viele systemische Therapieoptionen zur Verfügung stehen, ist der anti-TNF- α -Antikörper Adalimumab, welcher bereits länger bei der Psoriasisbehandlung eingesetzt wird, das einzige Biologikum, das bei der AI zugelassen ist.³⁴ Mit Secukinumab, einem IL-17A-Inhibitor, welcher bereits bei der Psoriasis eingesetzt wird, konnten bei einem Patienten, der sowohl von der Psoriasis als auch von der AI betroffen war, beide Erkrankungen erfolgreich behandelt werden. Da bei beiden Erkrankungen eine erhöhte IL-17-Expression vorliegt, könnte Secukinumab zukünftig eine mögliche therapeutische Option in der Behandlung der Acne inversa darstellen.⁸⁷

1.4 Der mTORC1-Signalweg und seine Rolle in der Pathogenese inflammatorischer Dermatosen

Der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg stellt einen zentralen Signalleitungsweg in eukaryotischen Zellen dar und spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und -überleben, Zellproliferation, Proteintranslation, Apoptose und Metabolismus.^{88,89} Die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) (Abb. 7) erfolgt durch Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) wie beispielsweise dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und dem Insulin-ähnlichen

Wachstumsfaktorrezeptor-1 (IGF-1R), durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sowie durch onkogenes Ratten-Sarkom-Protein (Ras).⁹⁰ Nach Ligandenbindung an RTKs oder GPCRs wird PI3-K entweder direkt oder über Adaptorproteine wie das Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) oder das Src-homologe-Domäne-2-Protein (SH2-Domäne), welches in der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-K enthalten ist, aktiviert.^{91,92} So aktivierte PI3-K katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) in der Membran. Die Proteinkinase B (PKB/Akt), eine Serin/Threonin-Kinase, und die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1) werden durch Bindung an PIP₃ an die Zellmembran rekrutiert. PDK1 phosphoryliert daraufhin PKB an Threonin 308 (T308). Außerdem wird PKB/Akt an Serin 473 (S473) von mTORC2 phosphoryliert.⁸⁸ PKB/Akt stellt ein zentrales Signalmolekül in fast allen Zellarten dar, das eine Vielzahl an Signalwegen wie z.B. den mTORC1-Signalweg reguliert.⁹³

Mammalian target of rapamycin (mTOR) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die die katalytische Untereinheit zweier unterschiedlicher Proteinkomplexe bildet, die als mTOR-Komplex 1 (mTORC1) und 2 (mTORC2) bezeichnet werden. mTOR reagiert auf verschiedene Signale wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Mitogene, Hormone, Aminosäuren und Zellstress (z.B. Hypoxie). Diese Stimuli aktivieren den PI3-K/Akt-Weg sowie weitere Signalwege und führen zur Phosphorylierung des Proteins Tuberin (TSC2), das an Hamartin (TSC1) gebunden ist und den TSC1/TSC2-Komplex bildet. Die Phosphorylierung führt zur Destabilisierung des Hamartin-Tuberin-Komplexes (Tuberous-Sclerosis-Complex = TSC 1/2 und TBC1D7). TSC2 wirkt als Guanosin-5-triphosphat-Protease (GTPase) aktivierendes Protein (GAP) auf die GTPase Rheb, welche gebundenes Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) hydrolysiert und damit inaktiviert. Bei aktiviertem PI3-K/Akt-Signalweg bewirkt das Auflösen des TSC-Komplexes, dass Rheb im Guanosintriphosphat-gebundenen Zustand verbleibt und damit mTORC1 aktiviert. Außerdem kann PKB über die Phosphorylierung von Proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) mTORC1 aktivieren, da dadurch die hemmende Wirkung von PRAS40 auf mTORC1 aufgehoben wird. Die Aktivierung von mTORC1, welcher aus der mTOR-Kinase selbst, einem regulatory associated protein of mTOR (RAPTOR) und dem

mammalian LST8/G protein β subunit like protein (MLST8/G β L) besteht, hat unterschiedliche Funktionen in der Regulation des Zellstoffwechsels. mTORC1 phosphoryliert nachgeschaltete Effektormoleküle wie das 4E-Binding-Protein-1 (4E-BP1) und die S6-Kinase-1 (S6K1), welche wiederum das nachgeschaltete ribosomale Protein S6 (S6) aktiviert. Diese Proteine spielen eine Rolle in der Translationskontrolle, sodass mTORC1 die Proteinbiosynthese reguliert. Darüber hinaus ist mTORC1 an der Regulation anaboler Prozesse beteiligt, hemmt Autophagie und trägt damit zum Zellwachstum bei.⁹⁴ Außerdem spielen sowohl mTORC1 als auch mTORC2 eine grundlegende Rolle bei der Regulation der angeborenen und erworbenen Immunität, steuern durch Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und Glutaryl Aminotransferase-Untereinheit A (GATA3) die Differenzierung, Reifung und Funktion von antigenpräsentierenden Zellen sowie von B- und T-Zellen. mTORC2 spielt außerdem eine zentrale Rolle bei der Organisation des zellulären Zytoskeletts und der Regulation des Zellüberlebens.⁹⁵

Auch in der Haut spielt der PI3-K/Akt/mTORC1-Signalweg eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase. Im Stratum basale gesunder Haut ist der mTORC1-Signalweg aktiv und steuert die Zellproliferation, während die Zelldifferenzierung blockiert wird. In suprabasalen Epidermisschichten ist mTORC1 inaktiviert, sodass Keratinozytendifferenzierung ermöglicht wird. Bei der Psoriasis hingegen ist der mTORC1-Signalweg in der gesamten Epidermis⁹⁶ durch die Wirkung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-17A, TNF- α hyperaktiviert, was zu einer übermäßigen Zellproliferation bei gleichzeitig gestörter Keratinozytenreifung führt.⁹⁷

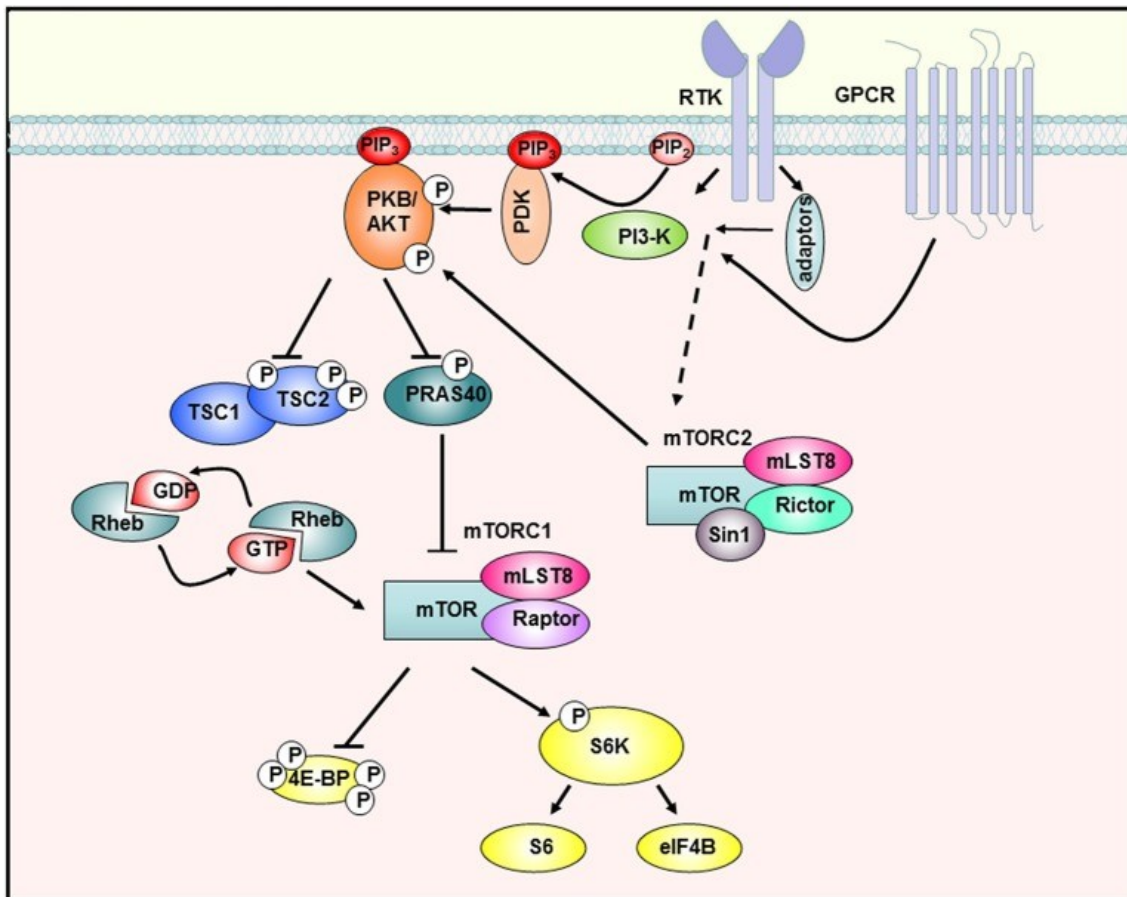


Abbildung 7: Der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg⁹¹

Die Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt zur Aktivierung der PI3-K, die anschließend PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert. Dadurch wird PKB an die Membran rekrutiert und durch PDK-1 und mTORC2 phosphoryliert. Die aktivierte PKB kann nun durch Phosphorylierung PRAS40 hemmen und damit mTORC1 aktivieren. Außerdem hemmt PKB durch Phosphorylierung zusätzlich TSC2, sodass die nachgeschaltete GTPase Rheb GTP-gebunden bleibt und ebenfalls mTORC1 aktivieren kann. Der vollständig aktivierte mTORC1-Komplex kann nun verschiedene nachgeschaltete Proteine wie S6K-1 und 4E-BP1 aktivieren, indem er sie phosphoryliert.

1.5 Der JAK/STAT3-Signalweg und seine Rolle in entzündlichen Dermatosen

Der JAK/STAT-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Vermittlung zellulärer Reaktionen auf verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren.⁹⁸ Er ist für diverse zelluläre Prozesse wie z.B. Zellproliferation und Differenzierung, Apoptose, Hämatopoese und Immunzellentwicklung von Bedeutung.⁹⁹ Die Januskinasen (JAK) JAK1, JAK2, JAK3 und Tyrosinkinase 2 (TYK2) gehören zu den Tyrosinkinasen. Nach der Bindung von Liganden an Zytokinrezeptoren kommt es zu einer Autophosphorylierung der gebundenen Januskinasen (Abb. 8). Phosphorylierte Januskinasen aktivieren anschließend die nachgeschalteten

Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs), von denen insgesamt 7 existieren (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6). So phosphorylierte STATs dimerisieren und wandern in den Zellkern ein, binden dort an spezifische Promotorsequenzen und regulieren so die Transkription.¹⁰⁰

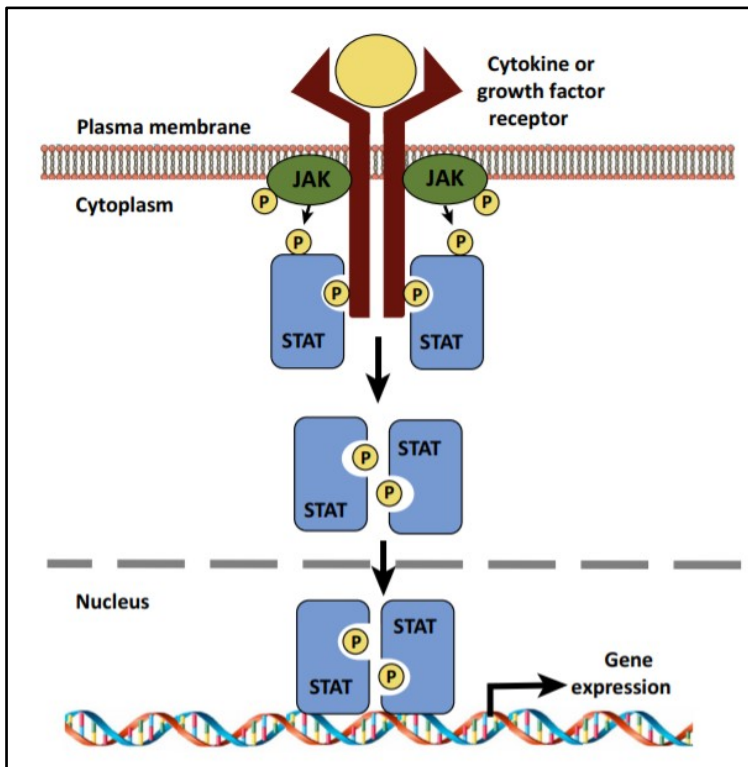


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung des JAK/STAT-Signalwegs¹⁰¹

Der JAK/STAT-Signalweg wird durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert. Die Bindung der Liganden an den Rezeptor führt zu JAK-Aktivierung und Autophosphorylierung. Daraufhin werden STATs rekrutiert und durch JAKs phosphoryliert, was zu einer Dimerisierung und Translokation in den Zellkern führt.

Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris spielt die dauerhafte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3. Eine STAT3-Hyperaktivierung wurde in verschiedenen Zelltypen, die an der Pathogenese der Psoriasis vulgaris beteiligt sind, wie TH17-Lymphozyten, Keratinozyten und $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen. Die Aktivierung erfolgt durch verschiedene Liganden, unter anderem auch durch viele Zytokine, die an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt sind wie IL-21, IL-22, IL-23, IL-26 und IL-29. Dabei kommt es zu einer Phosphorylierung von STAT3 durch JAK1, JAK2 und TYK2.¹⁰²

Vor allem die IL-23-TH17-Achse spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris. IL-23 wird von dendritischen Zellen und Keratinozyten

überexprimiert, es stimuliert TH17-Zellen in der Dermis, die anschließend proinflammatorische Zytokine wie IL-17A und IL-22 exprimieren.¹⁰³ Hierbei kommt STAT3 eine Rolle in der Differenzierung der TH17-Zellen zu. Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung in Abwesenheit von STAT3 aufgehoben wurde. Die Überexpression von STAT3 führt dagegen zu einer starken Erhöhung IL-17-produzierender Zellen und scheint für die Funktion von γ - δ -T-Zellen erforderlich zu sein, die durch die dermale Produktion von IL-17 zur Pathogenese der Psoriasis beitragen. Zusätzlich stimuliert IL-23 den JAK/STAT3-Signalweg, was zu einem Circulus vitiosus führt und die TH17-Zellen zur Produktion von IL-17 anregt. Obwohl IL-17 nicht direkt auf die JAK/STAT3-Signalübertragung angewiesen ist, führt die Blockade von vorgeschaltetem IL-23 über JAK-Inhibitoren zu einer allgemeinen Abnahme der IL-17-Spiegel.^{102,104}

STAT3 wird nach Stimulation durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren durch die Januskinase an Tyrosin 705 (Y705) phosphoryliert,¹⁰⁵ was, wie bereits erwähnt, zu einer Dimerisierung und der Translokation in den Zellkern führt. Zur vollständigen Aktivierung wird STAT3 außerdem durch zahlreiche weitere Kinasen an Serin 727 (S727) phosphoryliert.¹⁰⁶ mTORC1 kann ebenfalls die Gentranskription durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT3, Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) oder Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) regulieren.¹⁰⁷ Yokogami *et al.* zeigten, dass die durch den Ciliary neurotrophic factor (CNTF) induzierte STAT3 Phosphorylierung an S727 durch Rapamycin, einen mTORC1-Inhibitor,⁹¹ blockiert werden kann. Diese Studie zeigte, dass mTOR STAT3 an S727 phosphoryliert und Rapamycin die Transkriptionsaktivität von STAT3 reduziert.^{108,109} Diese Ergebnisse zeigen eine mögliche Interaktion zwischen dem mTORC1- und dem JAK/STAT-Signalweg.

1.6 Grundannahme und Zielsetzung

Wie die Psoriasis vulgaris, gehört die AI zu dem Formenkreis chronisch-entzündlicher Dermatosen. Ihre Pathophysiologie ist jedoch im Vergleich zur Psoriasis bisher nur unzureichend verstanden. Obwohl das Zytokinprofil der AI mittlerweile sehr gut untersucht ist,^{32,110} wurden die molekularen Veränderungen und insbesondere die an der Pathogenese beteiligten Signalwege bis heute nicht

erforscht und der Zusammenhang zwischen der aberranten Immunantwort und dysregulierten Keratinozytenfunktion kaum beleuchtet. Da die vorhandenen Therapieoptionen oft an ihre Grenzen stoßen, ist die Entwicklung neuer topischer oder systemischer Therapiemaßnahmen mit möglichst wenigen Nebenwirkungen und die Erforschung neuer Zielproteine, die als Therapietargets fungieren könnten, von großem Stellenwert. Aufgrund des Nachweises gleicher Zytokine in den Läsionen der Acne inversa und Ähnlichkeiten beider Erkrankungen in immunologischer Hinsicht, liegt es nahe, dass die Psoriasis und die AI eine ähnliche Pathophysiologie aufweisen. Die gemeinsamen histologischen Merkmale beider Erkrankungen wie die Epidermishyperplasie mit Reteleisten und die subepidermalen entzündlichen Infiltrate stützen diese Annahme.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der mTORC1-Signalweg⁹¹ sowie der STAT3-Signalweg¹⁰² in der Psoriasis vulgaris hyperaktiviert ist und eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielt. Die Aktivierung des mTORC1-Signalwegs durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-17A und TNF- α führt zu einer gesteigerten Keratinozytenproliferation bei gleichzeitig gestörter Differenzierung.⁹¹ Histologische Merkmale, wie epidermale Hyperplasie, deuten darauf hin, dass die Acne inversa ebenfalls eine keratinozytäre Erkrankung darstellt. Viele Autoren sprechen auch von einer autoimmunen Keratiniserungsstörung.^{111,112}

Buerger *et al.* zeigten, dass IL-1 β , IL-17A und TNF- α die mTOR-Kinase, PRAS40 und die nachgeschalteten Proteine wie 4E-BP1 und das ribosomale Protein S6 stark aktivieren.⁹⁷ Diese Zytokine sind nicht nur in Psoriasisläsionen vermehrt nachweisbar,¹¹³⁻¹¹⁵ sondern auch in den AI-Läsionen.¹¹⁰ Mittels Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnten Kelly *et al.* sowohl periläsional als auch läsional eine erhöhte Expression der genannten Zytokine in den AI-Hautproben im Vergleich zur gesunden Haut nachweisen.¹¹⁶ In einer anderen Studie mit 74 AI-Patienten wurde das Zytokinmuster aus Blutproben untersucht, 10 proinflammatorische Zytokine konnten nachgewiesen werden, darunter auch IL-1 β , IL-17A und Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1. Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass der Zytokinserumspiegel mit der klinischen Entzündungsaktivität korrelierte und untermauerten die Bedeutung der IL-1 β -IL-23-TH17-IL-17-Achse in der Pathogenese der AI.¹¹⁷ Witte-Händel *et al.* untersuchten mittels PCR die

Zytokine in den AI-Hautproben und verglichen diese neben der gesunden auch mit der Haut von Psoriasispatienten. Interessanterweise erreichten dabei IL-17A und TNF- α Werte, die sogar über denen in der Psoriasis lagen. Besonders auffällig war die Expression von IL-1 β , die weit über der in den Psoriasisproben lag.¹¹⁸

Ein ähnliches Zytokinprofil beider Dermatosen, Psoriasis vulgaris und Acne inversa, stützt die Hypothese über eine Gemeinsamkeit in immunologischer Hinsicht. Es stellt sich nun die Frage, ob proinflammatorische Zytokine auch in der Acne inversa eine Aktivierung des mTORC1-Signalwegs induzieren und ob dies in der AI epidermal analoge Effekte wie in der Psoriasis vulgaris hervorruft und zur Entstehung und Aufrechterhaltung der AI beiträgt.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg in der AI eine ähnliche Hyperaktivierung wie in der Psoriasis aufweist und zu einer epithelialen Dysfunktion und somit zum psoriatischen Phänotyp in der Acne inversa beiträgt. Hierzu sollten mittels immunhistochemischer Färbung sowohl die mTOR-Aktivität in AI-Läsionen als auch das Differenzierungsverhalten der Keratinozyten sowie die Entzündungs- und Proliferationsrate beurteilt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob der JAK/STAT3-Signalweg wie in der Psoriasis ebenfalls an der AI-Pathogenese beteiligt ist und hier durch die STAT3-Phosphorylierung eine mögliche Interaktion mit dem mTOR-Signalweg besteht.

Ergebnisse aus dieser Arbeit sollten folglich nicht nur Erkenntnisse zur Rolle des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs in der Pathogenese der Hidradenitis suppurativa liefern, sondern auch Hinweise geben, ob der Signalweg und die beteiligten Signalproteine zukünftig potenzielle Targets in der Acne inversa Therapie darstellen könnten, um neue therapeutische Ansatzpunkte für innovative Therapieoptionen zu eröffnen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Untersuchtes Gewebe

Zehn Patienten mit einer gesicherten Acne inversa-Diagnose (Hurley-Stadium II oder III) wurden ausgewählt, welche sich nach Ausschöpfen der systemischen

Therapieoptionen einer unabhängig von der Studie geplanten Operation (OP) unterzogen haben. Die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität bewertete die Studie als zustimmend (Geschäftsnummer 9/18) und die Deklaration von Helsinki wurde eingehalten. Es handelte sich dabei um 4 Frauen und 6 Männer im Alter von 24-56 Jahren (Tabelle 1), die nach einem Aufklärungsgespräch eine Einwilligungserklärung unterzeichneten. Es wurde eine großflächige Exzision der betroffenen, intertriginösen Hautareale vorgenommen und Proben aus verschiedenen definierten Bereichen, wie zum Beispiel periläsionale Haut, entzündeter Knoten und Fistelgang, entnommen.

Zum Vergleich wurden 6mm Stanzbiopsien läsionaler Haut zweier Psoriasispatienten entnommen (Ethikvotum der Frankfurter Universitätsklinik der Goethe-Universität (Geschäftsnummer E11/18; 144/12)). Gesunde Haut stammte vom Abfallmaterial von Mamma-OPs aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Frankfurt am Main. Außerdem wurden Präputiumproben und Hautproben von Bauch und Oberschenkel, welche als OP-Restmaterial angefallen sind, verwendet.

Tabelle 1: Acne inversa-Patientenliste

Patient	Geschlecht	Alter zum Zeitpunkt der Entnahme	Entnahmestelle
1	m	24	gluteal
2	m	25	Axilla beidseitig
3	m	33	Axilla beidseitig
4	m	32	Axilla links
5	w	52	Axilla beidseitig
6	w	56	inguinal beidseitig
7	m	34	Axilla beidseitig
8	w	37	Axilla beidseitig
9	w	40	gluteal/perianal
10	m	34	Axilla beidseitig

2.1.2 Verwendete Zelllinien

Für *in-vitro*-Untersuchungen wurde die spontan immortalisierte, humane, nicht tumorigene Keratinozytenzelllinie human adult low calcium temperature keratinocytes (HaCaT) verwendet.¹¹⁹ Die verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert.

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Artikelnummer	Hersteller	Zelltyp
HaCaT	300493	CLS	immortalisierte humane, nicht tumorigene Keratinozytenzelllinie

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Für die Anfertigung dieser Dissertation wurden folgende Chemikalien und Reagenzien verwendet.

Tabelle 3: Übersicht zu den verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe der Bestellnummer und des Herstellers

Chemikalien und Reagenzien	Bestellnummer	Hersteller
10x Tris/Glycine/SDS	1610772	Bio-Rad
2-Propanol ≥99,8 %	33539-2.5L	Honeywell
Albumin, IgG-frei, >98 %	3737.1	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat ≥98 %	9592.3	Carl Roth
Bromphenolblau Natriumsalz	A512.1	Carl Roth
Clarity Western ECL Substrate	1705061	Bio-Rad
D-(+)-Trehalose dihydrate from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , ≥99 %	T9531-5G	Sigma Aldrich

Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥99,5 %	A994.1	Carl Roth
Ethanol vergällt ≥99,8 %	K928.4	Carl Roth
FBS Superior	S 0615	Biochrom
Gibco™ DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement	61965026	Thermo Fisher Scientific
Gibco™ DPBS, no calcium, no magnesium	14190094	Thermo Fisher Scientific
Glycerin wasserfrei BioChemica	A1123	AppliChem
HIER Citrate Buffer pH 6,0 (10 X)	ZUC028-500	Zytomed Systems
HIER Tris-EDTA Buffer pH 9,0 (10 X)	ZUC029-500	Zytomed Systems
Mayer's nach Hämatoxylin	254766.1610	PanReac AppliChem
Methanol ≥99,8 % (GC)	32213-2.5L-M	Sigma Aldrich
Milchpulver	T145.2	Carl Roth
Natriumchlorid	10735921	Fisher Scientific
Normal Goat Serum Blocking Solution	S-1000	Vector Laboratories
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	26619	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	15140122	Thermo Fisher Scientific
Permanent AP Red Kit	ZUC001-125	Zytomed Systems
Quick Start™ Bradford	5000205	Bio-Rad
RIPA Buffer (10X)	9806S	Cell Signaling
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	3029.2	Carl Roth

SDS - Lösung 20 % reinst	A3942,1000	AppliChem
SignalStain® Antibody Diluent	8112L	Cell Signaling
TEMED ≥99 %	2367.3	Carl Roth
Tris-Wash Buffer B, TBS (20 X)	ZUC066-500	Zytomed Systems
Trizma® base Primary Standard and Buffer, ≥99,9 % (titration)	T1503	Sigma Aldrich
Trypsin (2,5 %)	15090046	Thermo Fisher Scientific
Tween® 20	9127.1	Carl Roth
UltraPure™ 0.5 M EDTA, pH 8.0	15575020	Thermo Fisher Scientific
Xylol (Isomerengemisch) ≥98 %	28973.363	VWR Chemicals

2.1.4 Antikörper

Für diese Arbeit wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Primärantikörper mit Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller

Epitop	Verdünnung	Spezies	Artikelnummer	Hersteller
CD3	Ready to use	Maus	AM322-5M	BioGenex
Cytokeratin 10	1:5000 (IHC)	Kaninchen	ab76318	abcam
Filaggrin	1:600 (IHC)	Kaninchen	905801	BioLegend
Involucrin	1:2000 (IHC)	Kaninchen	sc-28557	Santa Cruz
Ki-67	Ready to use	Kaninchen	KI681R06	DCS Innovative Diagnostik -Systeme

Mouse (G3A1) mAb IgG1 Isotype Control	IHC	Maus	5415S	Cell Signaling
Phospho- mTOR (Ser2448)	1:50 (IHC)	Kaninchen	2976	Cell Signaling
Phospho- mTOR (Ser2448)	1:250 (WB)	Kaninchen	5536	Cell Signaling
Phospho- PKB/Akt (Ser473)	1:2000 (WB)	Kaninchen	4060	Cell Signaling
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	1:5000 (WB) 1:1500 (IHC)	Kaninchen	2211	Cell Signaling
Phospho- STAT3 (Ser727)	1:250 (WB) 1:50 (IHC)	Kaninchen	9134	Cell Signaling
Phospho- STAT3 (Ser727)	1:500 (WB)	Maus	9136	Cell Signalling
Phospho- STAT3 (Tyr705)	1:200 (WB) 1:200 (IHC)	Kaninchen	9145	Cell Signaling
Rabbit (DA1E) mAb IgG XP® Isotype Control	IHC	Kaninchen	3900S	Cell Signaling
β-Actin	1:100 000 (WB)	Maus	A1978	Sigma

Tabelle 5: Übersicht der eingesetzten Sekundärantikörper mit Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller

Antikörper	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:3000 (WB)	7076S	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:1000 (WB) 1:2000 (WB)	7074S	Cell Signaling
Histofine® Simple Stain™	Ready to use	414151F	Nichirei Bioscience Inc.

2.1.5 Zytokine

Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Zytokine mit Artikelnummer und Hersteller

Zytokine	Artikelnummer	Hersteller
IL-17A	200-17	PeptoTech
IL-1 β	200-01B	PeptoTech
IL-22	200-22	PeptoTech
TNF- α	300-01A	PeptoTech

2.1.6 Chemische Inhibitoren

Tabelle 7: Übersicht der eingesetzten chemischen Inhibitoren mit Konzentration, Artikelnummer und Hersteller

Inhibitoren	Eingesetzte Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
Rapamycin	100 nM	553211	Calbiochem
Tofacitinib	50 nM	14703	CellSignaling

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Übersicht zu den verwendeten Materialien mit Angabe der Artikelnummer und des Herstellers

Materialbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
50 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhrchen	227270	Greiner bio-one
C-Chip	DHC-N01	NanoEnTek Inc.
Entellan® Neu	1079610500	Merck
Immobilon-P Membran	IPVH00010	Merck Millipore
MICROPLATTE, 96 WELL	655101	Greiner bio-one
Nunc™ EasYFlask™ Zellkulturflaschen	159910	Thermo Fisher Scientific
Präzisions-Deckgläser	LH26.1	Carl Roth
Stripette™ Serological Pipets	4488	Corning Incorporated
Thermo Scientific™ SuperFrost Plus™ Adhesion slides	10149870	Fisher Scientific
Whatman-Gel-Blotting- Papiere	260226693	My Neo Lab
Wilhelm Ulbrich™ Pasteur Pipets	10216234	Fisher Scientific
ZELLKULTUR MULTIWELLPLATTE, 12 WELL	665180	Greiner bio-one

2.1.8 Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer

Tabelle 9: Übersicht der Lösungen und Puffer mit Zusammensetzung

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
1 x TBS-T	100 ml 10x TBST in 900 ml VE H ₂ O mit 500 µl Tween® 20

10 x TBS für 1L Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (Waschlösung)	0,2 M Tris 1,5 M NaCl 0,5 % Tween® 20
10x Towbin Buffer (pH 8,3) (Transferpuffer)	25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
4 x SDS Proteinladepuffer	240 mM DTT 8 % SDS 250 mM Tris 40 % Glycerin 0,4 % Bromphenolblau
4 x Tris Puffer pH 6,8 (Sammelgel-Puffer) (Upper Tris)	500 mM Tris 0,4 % SDS
4 x Tris Puffer pH 8,8 (Trenngel-Puffer) (Lower Tris)	1500 mM Tris 0,4 % SDS
5x Laemmli Puffer (pH 8,5) (Laufpuffer)	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % SDS
APS	3 g APS in 10 ml Millipore Wasser (doppeltdestilliertes Wasser) 30 %
Blockierungslösung	5,0 % Magermilchpulver in 1 x TBST
BSA-Lösung	5,0 % BSA 0,01 % NaN ₃ in 1x TBST
EDTA 2 %	20 g EDTA in 1 Liter PBS ohne Ca/Mg pH auf 7,0 einstellen steril filtrieren bei -20 °C einfrieren
RIPA	500 µl 10x RIPA 50 µl PMSF in 5 ml Millipore H ₂ O

TBS für IHC	100 ml 10x TBS in 900 ml VE Wasser (Aqua dest.)
Trypsin/EDTA 0,125 %/0,1 %	2 ml Trypsin 2,5 % 2 ml EDTA 2 % 36 ml PBS ohne Ca und MG

2.1.9 Technische Geräte und Softwares

Tabelle 10: Übersicht zu den verwendeten Geräten mit Angabe des Herstellers

Geräte	Hersteller
Dampfgarer	Braun
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad
Drahtbügel aus rostfreiem Edelstahl für Färbegestell aus Glas	Carl Roth
Färbegestell	Carl Roth
Färbekasten mit Deckel	Carl Roth
Färbetröge	Carl Roth
GraphPad Prism	GraphPad Software
Heracell™ 240i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific
Heraeus™ Megafuge™	Thermo Fisher Scientific
Image Lab Software	Bio-Rad
iMark Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad
Lichtmikroskop Olympus CKX41	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad

Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 1.5 mm thick handcast gels	Bio-Rad
Nikon ECLIPSE 80i light microscope	Nikon
NIS Elements Software	Nikon
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die HaCaT-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einem Filterschraubverschluss von einer Größe von 175 cm² gehalten und in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), welchem 1 % Penicillin/Streptomycin (10 µl/ml bzw. 10 U/ml) und 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurden, kultiviert. Die Versuche wurden unter einer Sterilbank mit sterilen Materialien durchgeführt.

Zum Passagieren wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen wurden mit 3 ml Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) gewaschen. Der Puffer wurde abgesaugt und die HaCaT-Zellen wurden mit 3 ml einer 0,2 % Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung für 2 min bei Raumtemperatur behandelt. EDTA komplexiert Mg²⁺ und Ca²⁺, somit stehen diese Ionen den adhäsionsvermittelten Adhäsionsmolekülen wie Integrinen nicht mehr zur Verfügung und die Zelladhäsion an der Kulturflasche wird vermindert. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsinierung vom Boden der Flasche gelöst. Trypsin zerstört die Zelladhäsionsmoleküle durch Spaltung der Peptidbindung zwischen Lysin und Arginin. Dazu wurden 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und für einige Minuten im Brutschrank belassen. Wenn sich die Zellen ablösten, d.h. eine kugelige Form annahmen (dies wurde mikroskopisch kontrolliert), wurde das Trypsin mit 10 ml Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm (22 °C) 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10

ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. 10 µl der gut durchmischten Zellsuspension wurden in die Kammer aufgetragen und die Zellen wurden in den 4 Eckquadraten der Kammer unter dem Mikroskop gezählt, anschließend wurde der Mittelwert berechnet. Um die Gesamtzellzahl in der vorhandenen Zellsuspension zu berechnen, wurde die folgende Formel benutzt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert} \times \text{Volumen im Falcon-Röhrchen} \times 1 \cdot 10^4$$

Die Zellsuspension wurde auf die gewünschte Zellzahl durch Verdünnung mit Medium eingestellt (Tabelle 11) und in die Kulturplatten gegeben.

Tabelle 11: Zellzahl zur Aussaat bei Versuchen

Platte	Zelldichte
6 Well Platte	4x 10 ⁵ Zellen
12 Well Platte	2 x 10 ⁵ Zellen

Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert, am nächsten Tag wurde das Kulturmedium entfernt und für 24 Stunden ein FCS-freies Mangelmedium hinzugegeben, um die Signalwege innerhalb der Zellen herunterzuregulieren. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Inhibitoren und Zytokinen stimuliert.

Herstellung von Proteinlysaten

Zur Ernte wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und nach Zugabe von Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) (50 µl pro Well bei einer 12 Well Platte, 75 µl bei einer 6 Well Platte) 20 min auf Eis gestellt. Nachdem die Zellen mithilfe eines Scrapers abgeschabt und in Mikroreaktionsgefäße überführt wurden, wurden die Proben bei 13000 rpm (4 °C) für 10 min zentrifugiert. Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurden die Überstände verwendet. Jeweils 4 µl der Proteinlysate bzw. der Bovines Serumalbumin (BSA)-Standardproteinlösungen wurden in die Wells einer 96 Well Platte pipettiert und mit jeweils 200 µl Bradford-Lösung versetzt. Die Standardproteinlösungen mit den Konzentrationen 0,125/0,25/0,5/0,75/1,0/1,5 und 2,0 µg/l wurden zur Erstellung einer Eichgerade benutzt. Der RIPA Puffer (1x) diente als Nullwert.

Die Messung der Absorption wurde mit dem iMark Microplate Absorbance Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt.

Die unbekannt Konzentrationen der Proteinlysate wurden über die Eichgerade mittels der Geradengleichung ermittelt. Hierzu wurden die Proteinlysate mit RIPA-Puffer (1x) so angepasst, dass alle Proben die gleiche Proteinkonzentration hatten. Zur Denaturierung und Verleihung einer negativen Gesamtladung der Proteine wurde schließlich noch Natriumdodecylsulfat (SDS) Probenpuffer (4x) in einer finalen 1x Konzentration hinzu pipettiert. Dadurch konnte die Eigenladung der Proteine überdeckt werden. Diese Proteingemische konnten bei -20 °C langfristig gelagert werden.

2.2.2 Gelelektrophorese und Western Blot

Auftrennung der Proteine mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bevor die Proteine im Western Blot analysiert werden konnten, mussten sie entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden, dies gelang mithilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Proteinproben wurden mit dem dazugegebenen SDS-Puffer bei 94 °C für 4 Minuten inkubiert, dadurch wurden die Proteine denaturiert. Ihre Sekundär- und Tertiärstrukturen gingen verloren. Da SDS negativ geladen ist, überdeckt es die Eigenladung der Proteine, die SDS-gebundenen Proteine weisen alle eine negative Ladung auf, was die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe ermöglicht. Für die Auftrennung wird ein Gel benötigt, welches aus einem dreidimensionalen Netzwerk mit definierten Porengrößen besteht. Entsprechend Tabelle 12 wurden alle Trenn- und Sammelgelkomponenten bis auf Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) miteinander gemischt. Die beiden zuletzt genannten Bestandteile wurden erst kurz vor dem Gießen der Gele dazugegeben, da sie sofort zu einer Polymerisation führen. Je größer der Acrylamid-Anteil, desto enghmaschiger ist das Netz und desto besser erfolgt die Auftrennung kleinerer Proteine. Die fertigen Gele wurden in eine Mini-Protean® Tetra Elektrophoresekammer gesetzt, die mit 1x Laemmli-Puffer aufgefüllt wurde und die Proteinproben wurden vorsichtig in die Geltaschen gefüllt. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 200 V für 45 min beginnen

die negativ geladenen Proteine zur positiv geladenen Anode zu laufen, dabei laufen die kleinen Proteine schneller durch die Gelporen als die großen. Ein ebenfalls aufgetragener Proteinmarker zeigt die Auftrennung an.

Tabelle 12: Pipettierschema für die Sammel- und Trenngele der SDS-Page

	Trenngel					Sammelgel
	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %	5 %
Aqua dest.	5,4 ml	4,7 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,4 ml	2,3 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2 ml	2,7 ml	3,3 ml	4 ml	5 ml	0,67 ml
4x Tris/SDS pH 6,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
4x Tris/SDS pH 8,8	-	-	-	-	-	1,0 ml
APS 30 %	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl

Western-Blot

Beim Western Blot wurden die zuvor in einem Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Für den Transfer wurde ein Sandwich aus jeweils 2 Blotting-Schwämmen und Whatman-Gel-Blotting-Papieren, der Membran und dem Gel aufgebaut und in eine Blotting-Kammer gefüllt mit Towbin Transfer-Puffer eingesetzt. In die Blotting-Kammer wurde zusätzlich ein Eisblock eingesetzt, um eine Überhitzung zu verhindern. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte bei 100 V für 60 Minuten.

Waschen und Blocken der Membran

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver-Lösung (in 1x Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween (TBST)) für 30 min inkubiert, um die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen, die nicht von Antikörpern erkannt werden, zu blockieren.

Immunologischer Nachweis der Zielproteine

Für die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper wurde der Antikörper in 5 % BSA/TBST in einem 50 ml Falcon-Röhrchen verdünnt.

Tabelle 13: Verdünnung der Primärantikörper für den Western-Blot

Primärantikörper	Verdünnung	Trenngel
Aktin	1:100000	10 %
P-mTOR	1:250	6 %
P-PKB	1:2000	10 %
P-S6	1:5000	10 %
P-STAT3 Serin	1:500 (#9136) 1:250 (#9134)	10 %
P-STAT3 Tyrosin	1:200	6 %

Die Membran wurde in die Primärantikörper-Lösung eingelegt und über Nacht bei 4 °C auf einem Rolltisch inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein 3x5-minütiges Waschen der Membran in 1xTBST. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte im 50 ml Falcon-Röhrchen bei RT für 60 min.

Der Primärantikörper richtet sich dabei gegen das gesuchte Antigen, während sich der Sekundärantikörper gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers richtet. Es wurden Sekundärantikörper verwendet, die mit horseradish peroxidase (HRP) gekoppelt sind. Dieses Enzym setzt spezifische Chemilumineszenz-Substrate (Clarity Western ECL Substrate Kit) um, sodass Licht erzeugt wird und die Proteinbanden durch eine entsprechende Kamera (ChemiDoc XRS+ System) detektiert werden können. Die Membran wurde dazu in eine Plastikfolie gelegt und mit jeweils 500 µl Reagenz Peroxide und Luminol aus dem Kit versetzt. Die Entwicklerlösung wurde gleichmäßig über der gesamten Membran verteilt und für etwa 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3 Histologische und immunhistochemische Färbungen

Probenvorbereitung

Das Gewebe wurde zunächst zur Härtung für mehrere Stunden in 4,5 %iger Formalinlösung fixiert. Vor der Einbettung des Gewebes in Paraffin musste dieses zunächst durch Inkubation in Alkohol dehydriert werden. Die in Formalin

fixierten Proben wurden dazu in einem Entwässerungsautomaten "ASP 200S" durch eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeschleust und anschließend in einen Paraffinblock eingebettet, um aus diesem Paraffinschnitte anfertigen zu können.

Paraffinschnitte

Mit einem Rotationsmikrotom wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und in ein Wasserbad (T = 40 °C) zum Strecken überführt. Nach dem Strecken wurden die Schnitte auf Objektträger aufgebracht und trockneten anschließend 15 min bei 60 °C. Die Schnitte können vor dem Färben bei RT mehrere Jahre gelagert werden. Sowohl vor histologischen als auch vor immunhistologischen Färbungen mussten die Schnitte entparaffiniert und rehydriert werden.

Entparaffinieren und Rehydrieren

Als Vorbereitung für histologische und immunhistologische Färbungen wurden die Paraffinschnitte 3x je 5 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (2x je 3 min Isopropanol, 3 min 96 % Ethanol, 3 min 70 % Ethanol und 5 min Aqua dest.) rehydriert.

Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung ist eine schnelle Übersichtsfärbung, dabei werden mit der Hämalaulösung nach Mayer Zellstrukturen, die sauer sind, wie Zellkerne, dunkelblau bis schwarz gefärbt. Alle anderen Gewebsstrukturen, die basisch sind, wie Zytoplasmaproteine, werden mit Eosin rötlich gefärbt. Die Durchführung der HE-Färbung erfolgte nach Herstellervorgaben. Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden 10 min in Hämatoxylinlösung gefärbt und anschließend 3 min mit destilliertem Wasser gespült. Schließlich wurden die Schnitte 2 s in Chlorwasserstoff (HCL) /Alkohol (1 %) gehalten, 4 min mit destilliertem Wasser gespült, für 4 min in Ethanol (96 %) und anschließend 30 s in eine alkoholische Eosinfärbelösung getaucht. Die gefärbten Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (96 % 30 s, 96 % 60 s, 100 % 90 s, 100 % 90 s), 2 min in Xylol inkubiert und zum Schluss mit Entellan eingedeckt.

Immunhistochemische Färbungen

Mittels Immunhistochemie (IHC) können verschiedene Zielproteine im Gewebe angefärbt werden. Bei der IHC wird im ersten Schritt ein Primärantikörper, der spezifisch gegen das Zielprotein gerichtet ist, aufgetragen. Im zweiten Schritt wird auf das Gewebe ein Sekundärantikörper gegeben, der sich gegen den Primärantikörper richtet und an das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist, welches markierte Strukturen mittels einer lokalen enzymkatalysierten Farbreaktion histochemisch sichtbar macht.

Entparaffinieren und Inkubation mit Primärantikörper

Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte (siehe oben) wurden diese 20 min im Citrat- bzw. EDTA-Puffer (10 ml EDTA-/Citrat-Puffer + 90 ml Aqua dest.) in einem Dampfgerät bei 95 °C hitzebehandelt, um die Antigenepitope zu demaskieren. Dafür wurde der Dampfgerät vorgeheizt, um die Puffer auf die entsprechende Temperatur zu bringen. Nach dem Freilegen der Epitope wurden die Schnitte zunächst im Puffer belassen und 20 min bei RT abgekühlt. Folgend wurden sie nochmals 1x5 min in destilliertem Wasser und 1x5 min in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden Primärantikörpern inkubiert. Alle Primärantikörper wurden laut der Angaben in Tabelle 14 zuvor im Verdünnungspuffer SignalStain® (CellSignaling) verdünnt. Eine Ausnahme stellte der anti-Phospho-mTOR (P-mTOR) Antikörper dar, der mit TBST und 5 % Normal Goat Serum (NGS) verdünnt wurde. Bei anti-Ki-67 und anti-Cluster of Differentiation 3 (CD3) handelt es sich um „ready-to-use“ Antikörper, die ohne Vorverdünnung direkt verwendet werden konnten. Als Negativkontrolle wurde der Isotyp-Antikörper, der der gleichen Spezies entspricht wie der Primärantikörper, in der in Tabelle 14 genannten Verdünnung aufgetragen und ebenfalls über Nacht inkubiert. Die Verdünnung erfolgte dabei ebenfalls in SignalStain®, bei Ki-67 wurde TBS als Isotyp-Kontrolle benutzt.

Tabelle 14: Antikörperverdünnungen für die immunhistologische Färbungen

Epitop	Puffer	Isotyp-Kontrolle	Antikörperkonzentration
CD3	EDTA	Maus 1:50	Ready to use
Cytokeratin 10	EDTA	Kaninchen 1:8,1	1:5000
Filaggrin	Citrat	Kaninchen 1:2,5	1:600
Involucrin	Citrat	Kaninchen 1:12,5	1:2000
Ki-67	EDTA	TBS	Ready to use
P-mTOR	Citrat	Kaninchen 1:27,8	1:50
P-S6	Citrat	Kaninchen 1:131,6	1:1500
P-STAT3 Serin	Citrat	Kaninchen 1:19	1:50
P-STAT3 Tyrosin	EDTA	Kaninchen 1:25	1:200

Inkubation mit Sekundärantikörper und Dehydrierung

Nachdem die Schnitte über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert wurden, wurden sie zunächst 2x5 min in TBS gewaschen und 30 min mit Sekundärantikörper (Histofine Simple Stain AP) inkubiert. Nach 2 weiteren Waschvorgängen in TBS (jeweils 5 min) folgte eine bis zu 30-minütige Inkubation mit der Substratlösung (Permanent AP-Red-Kit). Der Sekundärantikörper, der mit dem Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist, löst die Farbentstehung mit einer Enzym-Substrat-Reaktion aus. Diese Farbentstehung beobachtete man nach der Substratzugabe unter dem Mikroskop. Sobald diese erfolgte, wurde die Färbung gestoppt, indem die Schnitte für 2 min in destilliertes Wasser gelegt wurden. Anschließend folgte jeweils 2 min die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer und Bläuen der Schnitte in Leitungswasser. Zum Schluss wurden sie

in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert: 2x2 min in 96 % Ethanol, 2x3 min in Isopropanol und 2x3 min in Xylol. Der letzte Schritt ist das Eindecken mit Entellan.

Auswertung

Mikroskopische Aufnahmen erfolgten mit einem Nikon Eclipse 80i Mikroskop und der mit ihm gekoppelten NIS-Elements – Bildverarbeitungssoftware. Die gesamten Schnitte wurden dabei mit dem Mikroskop in einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde schließlich aus den aufgenommenen Bildern ein Ausschnitt der Größe 1298 px x 1298 px gewählt.

Zur quantitativen Auswertung wurde besonders auf die Verteilung der Färbung innerhalb der Epidermis und auf ihre Stärke geachtet. Das Vorhandensein der Färbung einzelner Epidermisschichten wurde mit den Punkten 0 oder 1 bewertet, die Bewertung der Farbtintensität erfolgte gemäß einer Skala von 0-3. Zur Auswertung Ki-67 positiver Zellen sowie P-STAT3 Y705 positiver Zellen wurde eine gleich große Fläche definiert (1500 px x 4500 px) und innerhalb dieser wurden die gefärbten Zellkerne gezählt. Zur quantitativen Auswertung des Entzündungsmarkers CD3 wurde innerhalb der definierten Fläche (1500 px x 4500 px) der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche berechnet, indem die gefärbten Areale markiert und zur Gesamtfläche ins Verhältnis gesetzt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Aktivität des mTORC1-Signalwegs in Acne inversa-Läsionen

Im Rahmen der Psoriasis-Pathogenese kommt es zu einer zytokinvermittelten Hyperaktivierung des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs, welche zu verstärkter Keratinozytenproliferation bei gleichzeitig gestörter Differenzierung beiträgt. Aufgrund immunologischer und histologischer Gemeinsamkeiten beider Dermatosen sollte untersucht werden, ob der Signalweg ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese der AI spielt und bei dieser Erkrankung hyperaktiviert ist. Sowohl läsionale als auch periläsionale Haut von 10 AI-Patienten wurde dazu immunhistochemisch mit Antikörpern gegen P-mTOR S2448 und das

nachgeschaltete ribosomale Protein P-S6 S235/6 gefärbt und mit gesundem Gewebe sowie Psoriasisläsionen verglichen. Die Ergebnisse werden im Folgenden anhand von 3 Patienten veranschaulicht (Abb. 9).

Die Kinase mTOR zeigte im gesunden Gewebe kaum Phosphorylierung und damit auch keine Aktivität (Abb. 9.1a). Das mTORC1 nachgeschaltete ribosomale Protein S6 hingegen zeigte in der gesunden Haut eine Phosphorylierung im Stratum granulosum (Abb. 9.1f). In Psoriasisplaques war mTORC1 sowohl im Stratum basale als auch in den suprabasalen Epidermisschichten stark phosphoryliert und damit hyperaktiviert (Abb. 9.1b), während das ribosomale Protein S6 nur in den suprabasalen Epidermisschichten Aktivität zeigte (Abb. 9.1g). Erstaunlicherweise konnte bereits in der periläsionalen Haut aller drei AI-Patienten eine erhöhte mTOR-Aktivität nachgewiesen werden. Während sich diese bei Patient 1 lediglich auf die suprabasalen Schichten begrenzte (Abb. 9.1c), reichte die Färbung bei Patient 6 und 7 bis in die Basalzellschicht hinein (Abb. 9.1d, 9.1e). Bei dem an Serin-235/6 phosphoryliertem S6 ließ sich ein ähnliches Muster beobachten, auch hier konnte periläsional im Vergleich zum gesunden Gewebe eine erhöhte Aktivität festgestellt werden, nicht nur im Stratum granulosum, sondern auch im Stratum spinosum (Abb. 9.1h-j). In AI-Läsionen, wie zum Beispiel in einem Knoten (Abb. 9.2a, c) oder in einem entzündeten Hautareal (Abb. 9.2b), konnte auch hier im Vergleich zu gesunder Haut eine mTOR-Hyperaktivität detektiert werden. Diese erstreckte sich in der entzündeten Läsion sogar über die gesamte Epidermis und war mit der Aktivitätsstärke in der Psoriasis vergleichbar (Abb. 9.1b). In den Knoten zeigte sich im Vergleich zur Psoriasis eine geringere Färbung mit dem Antikörper gegen P-mTOR S2448, die lediglich auf das Stratum granulosum und die oberen Stratum spinosum-Schichten begrenzt war (Abb. 9.2a, c). Die Aktivität von S6 beschränkte sich in den Knoten und der entzündeten Läsion, ähnlich wie periläsional, auf die suprabasalen Epidermisschichten (Abb. 9.2d-f). Interessanterweise ließ sich in den Fisteln der drei Patienten eine unterschiedliche mTOR- und S6-Aktivität beobachten (Abb. 9.3). Während bei Patient 1 mTOR an S2448 nur eine leichte Phosphorylierung und damit nur schwache Aktivität aufwies (Abb. 9.3a), konnte bei Patient 6 und Patient 7 eine sehr starke Färbung nachgewiesen werden (Abb. 9.3b-d). Besonders eindrucksvoll war an dieser Stelle erneut die verstärkte mTOR-Aktivität in der

gesamten Epidermis bei Patient 6 (Abb. 9.3b). Die S6-Aktivität korrelierte in den Fisteln mit der von mTOR und fiel vor allem bei Patient 6 und 7 stark aus (Abb. 9.3f-h). Ähnlich wie bei P-mTOR, zeigte die Fistel von Patient 6 eine sowohl basale als auch suprabasale S6-Aktivität (Abb. 9.3f). Das phosphorylierte ribosomale Protein S6 konnte in der Fistel bei Patient 7 im Vergleich zur gesunden Haut sowohl im Stratum granulosum als auch in den oberen Stratum spinosum-Schichten vermehrt nachgewiesen werden (Abb. 9.3g, h).

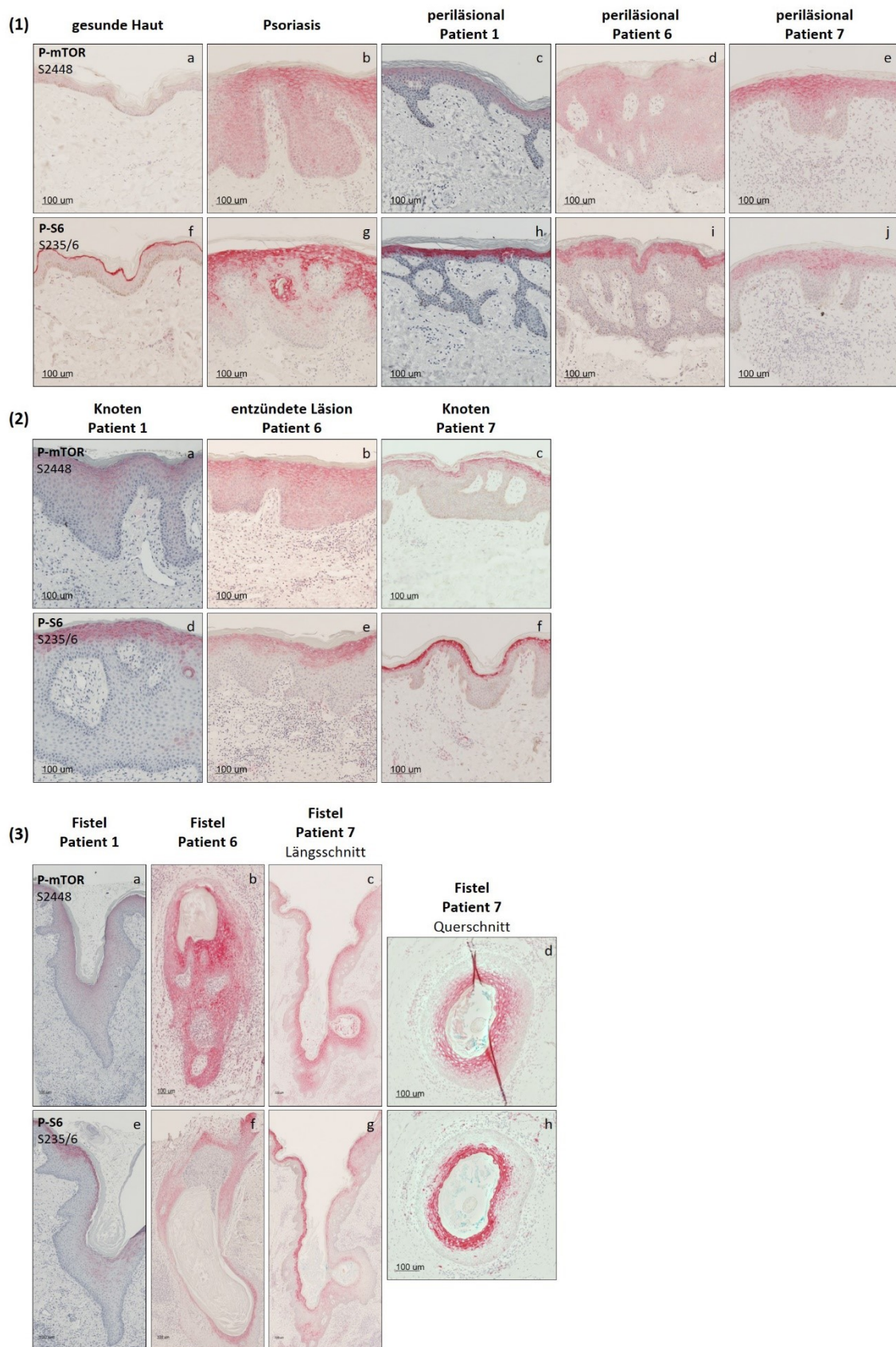


Abbildung 9: Differenzielle mTOR-Aktivität an unterschiedlichen AI-Läsionsstellen

Hautproben von gesundem Gewebe (Mamma) (1 a, f), psoriatischen Plaques (1 b, g), sowie periläsionaler (1 c, d, e, h, i, j) und läsionaler Haut (2 a-f; 3 a-h) von 10 AI-Patienten wurden mit Formalin fixiert, in Paraffin

eingebettet und mit Antikörpern gegen P-mTOR S2448 (#2976, CellSignaling) (1 a-e, 2 a-c, 3 a-d) und P-S6 S235/6 (#2211, CellSignaling) (1 f-j, 2 d-f, 3 e-h) über Nacht immunhistochemisch gefärbt. Zur Detektion wurde Histofine SimpleStain AP Multi (Nichirei Bioscience) verwendet und die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Zur Veranschaulichung ist hier anhand von drei Patientenbeispielen (Patient 1=gluteal, Patient 6=inguinal, Patient 7=axillär) die Aktivität von mTOR und S6 in unterschiedlichen AI-Läsionen dargestellt. Objektiv 10x, Balken = 100 µm

Für einen besseren Überblick über das gesamte Patientenkollektiv wurden mehrere IHC-Färbungen von allen 10 Patienten quantitativ ausgewertet. Diese spiegeln das beschriebene Aktivierungsmuster von mTOR und S6 wider (Abb. 10). In der gesunden Haut wurde lediglich im Stratum granulosum und Stratum spinosum eine schwache mTORC S2448-Phosphorylierung detektiert (Abb. 10a). Das ribosomale Protein S6 zeigte in der gesunden Haut dagegen nur im Stratum granulosum eine Phosphorylierung, hier konnte im Vergleich zu P-mTOR S2448 jedoch eine etwas stärkere Färbung beobachtet werden (Abb. 10b). In Psoriasisplaques war mTOR bis auf das Stratum corneum in der gesamten Epidermis stark phosphoryliert und damit hyperaktiviert (Abb. 10a). Interessanterweise bestand in den psoriatischen Hautproben im Gegensatz dazu keine Phosphorylierung von S6 im Stratum basale (Abb. 10b).

Vergleicht man die Färbungen der AI-Hautproben mit denen der gesunden Haut und der Psoriasis so zeigte sich, dass mTOR in allen AI-Läsionen in der gesamten Epidermis an S2448 hyperphosphoryliert war (Abb. 10a). Auffällig war die sehr hohe mTOR-Aktivität in makroskopisch gesunden periläsionalen Proben von AI-Patienten, diese war sogar teilweise höher als in den übrigen Läsionen, wie in der Fistel oder im Knoten. Interessanterweise war die Expression von phosphoryliertem mTOR-Komplex im Stratum basale der AI-Proben insgesamt viel höher als in der Psoriasis. Die mTOR-Aktivität war vor allem in Läsionen mit hoher Entzündung signifikant erhöht, besonders eindrucksvoll konnte man dies an der Färbung des entzündeten Knotens erkennen, wo die P-mTOR-Expression sowohl im Stratum basale als auch in den suprabasalen Zellschichten im Vergleich zur gesunden Haut, der Psoriasis und den restlichen AI-Läsionen deutlich höher lag. In den Knoten mit fehlenden Entzündungszeichen und in den Fisteln war die Aktivität zwar im Gegensatz zu den restlichen AI-Läsionen etwas geringer, lag jedoch noch deutlich über der Aktivität in der gesunden Haut.

Die Aktivität von S6 korrelierte teilweise mit der von mTOR, auch hier war

auffällig, dass im Vergleich zu Psoriasis und gesundem Gewebe die Expression in den AI-Läsionen insgesamt höher ausfiel (Abb. 10b). In den AI-Läsionen reichte die Färbung sogar bis in das Stratum basale hinein, wobei die Aktivität in den suprabasalen Schichten immer noch am größten war. Auch hier war, ähnlich wie bei P-mTOR, anhand der Stärke der Färbung eine höhere Aktivität im Stratum basale periläsional und im entzündeten Knoten nicht zu übersehen. Insgesamt konnte vergleichbar mit P-mTOR, die höchste Aktivität von S6 periläsional, im entzündeten Knoten und der entzündeten Läsion festgestellt werden. Zusammenfassend konnte eine massiv erhöhte mTORC1-Aktivität in den AI-Läsionen detektiert werden, abhängig vom Schweregrad der AI-Läsion war diese in den einzelnen Epidermisschichten sogar teilweise höher als in der Psoriasis vulgaris.

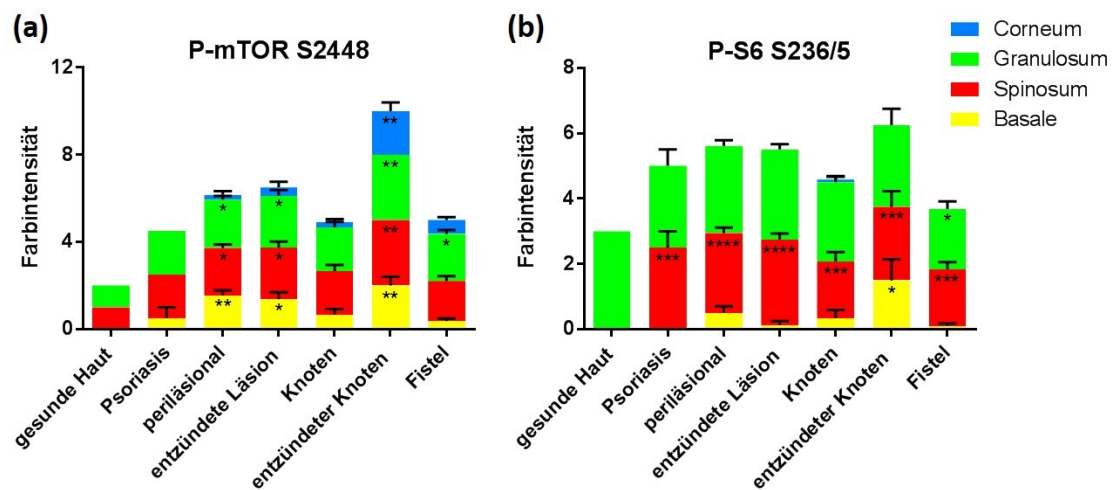


Abbildung 10: mTOR und S6 zeigen Hyperaktivierung in AI-Läsionen

Quantitative Auswertung der Intensität der immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern spezifisch für P-mTOR S2448 (a) und P-S6 S236/5 (b) von gesunder Haut, psoriatischer Haut und Hautproben aller 10 AI-Patienten und ihre Verteilung innerhalb der einzelnen Epidermisschichten. Die Bewertung der Farbintensität erfolgte gemäß einer Skala von 0-3. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte +/- standard error of the mean (SEM). (a) Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Hautproben mit dem Antikörper gegen P-mTOR S2448: gesunde Haut n=4, Psoriasis n=2, periläsional n=18, entzündete Läsion n=8, Knoten n=12, entzündeter Knoten n=4, Fistel n=19. (b) Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Hautproben mit dem Antikörper gegen P-S6 S236/5: gesunde Haut n=3, Psoriasis n=2, periläsional n=18, entzündete Läsion n=8, Knoten n=12, entzündeter Knoten n=4, Fistel n=19. Die statistische Signifikanz wurde mit zweiseitigem analysis of variance (ANOVA) und Fisher's Least Significant Difference (LSD) Test im Verhältnis zum gesunden Gewebe berechnet (keine Angabe=nicht signifikant, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001).

3.2 Untersuchung des epidermalen Differenzierungsmusters in Acne inversa-Läsionen

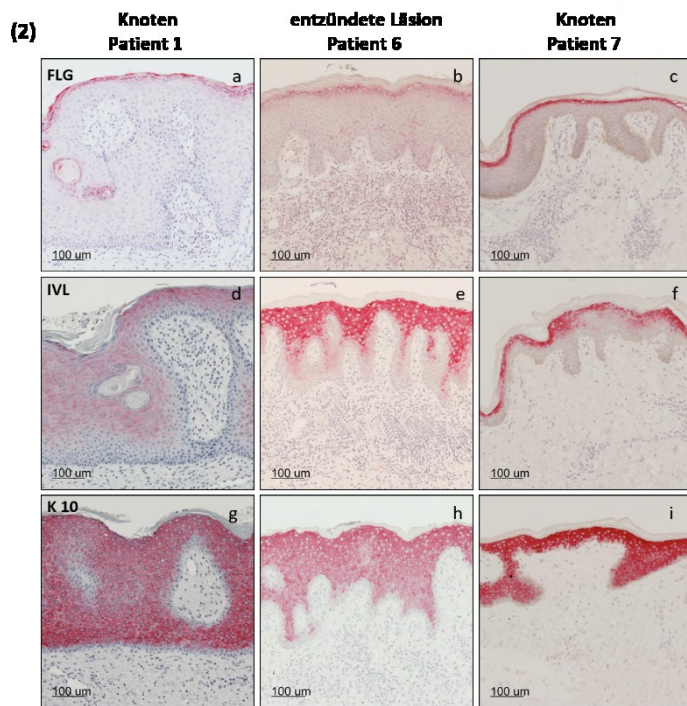
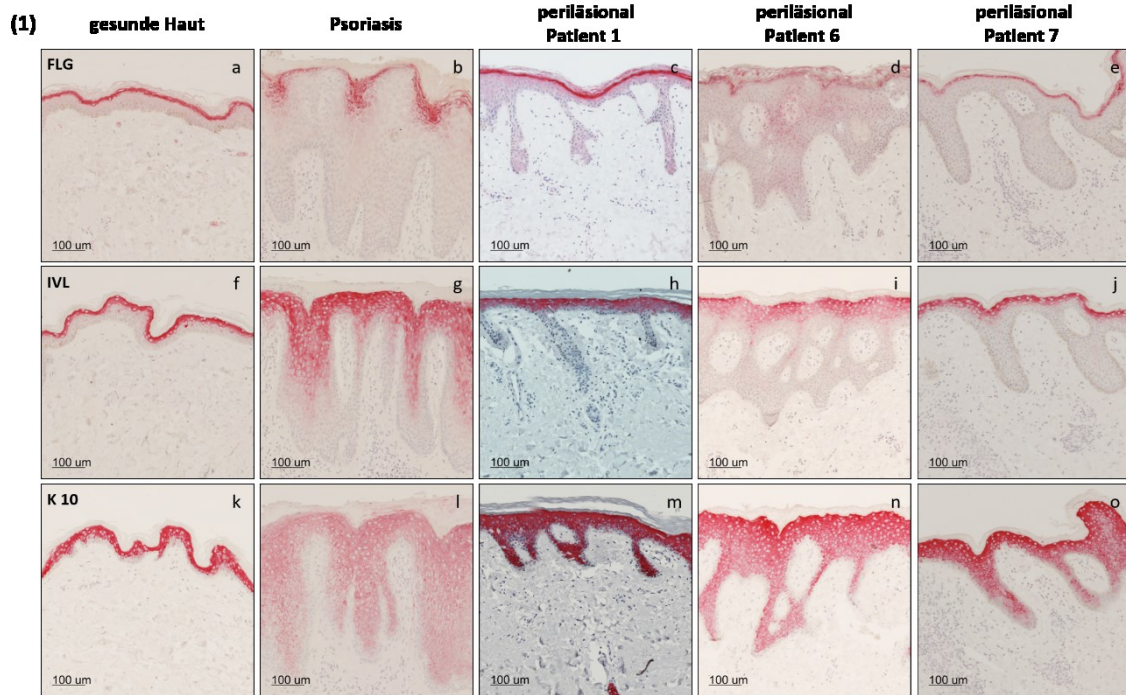
Neben der gesteigerten Proliferation zeichnen sich die Keratinozyten in der Psoriasis vulgaris durch eine deutlich gestörte Differenzierung aus.¹²⁰ Da die Acne inversa histologisch ebenfalls eine psoriasiforme Epidermishyperplasie aufweist, wurde im Rahmen dieser Dissertation immunhistochemisch das Differenzierungsmuster in den AI-Läsionen mithilfe der Differenzierungsmarker Filaggrin, Involucrin und Cytokeratin 10 untersucht und mit gesundem Gewebe und Psoriasisläsionen verglichen. Die Ergebnisse werden im Folgenden anhand von 3 Patienten veranschaulicht (Abb. 11).

Gesunde Haut zeigte wie erwartet eine durchgehende Expression von Filaggrin im Stratum granulosum und eine leichte Expression im Stratum corneum (Abb. 11.1a). In Psoriasispräparaten war eine lückenhafte, jedoch stärkere Expression von Filaggrin erkennbar (Abb. 11.1b). Die Färbung zeigte sich im Vergleich zur Normalhaut aufgrund der größeren Gesamtepidermisdicke deutlich verbreitert, reichte jedoch nicht in das Stratum spinosum hinein. In periläsionalen Hautproben der AI-Patienten zeigte sich verglichen mit gesunder Haut die pathologisch veränderte Dicke der Epidermis und die vermehrte Expression in der Granularzellschicht (Abb. 11.1c-e). Die stärkere periläsionale Filaggrinexpression in der AI fiel besonders bei Patient Nr. 1 auf (Abb. 11.1c). In den Knoten von Patient 1 und 7 (Abb. 11.2a, 11.2c) und in der entzündeten Läsion von Patient 6 (Abb. 11.2b) blieb die Expression wie in der gesunden Haut und in der Psoriasis auf das Stratum granulosum und das Stratum corneum begrenzt. In den Fisteln der drei Patienten begrenzte sich die Färbung zwar auch auf die beiden Schichten, es ließ sich jedoch anhand der Farbintensität im Stratum granulosum im Vergleich zur gesunden Haut bei allen drei Patienten eine reduzierte Expression feststellen (Abb. 11.3a-d).

Involucrin, welches in der gesunden Haut eine Expression im oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum zeigte (Abb. 11.1f), wies in der Psoriasis eine ausgedehntere Expression auf, die aufgrund der gestörten Differenzierung bereits in tieferen Epidermisschichten erkennbar war und entlang der prolongierten Reteleisten sogar bis in die tiefen Schichten des Stratum spinosum reichte (Abb. 11.1g). Bei den AI-Proben ließ sich periläsional ein ähnliches

Muster beobachten, hier zeigte sich ebenfalls im Vergleich zur gesunden Haut eine Involucrin-Expression im Stratum granulosum mit einer weiteren Ausbreitung in das Stratum spinosum hinein (Abb. 11.1h-j). In der entzündeten Läsion (Abb. 11.2e) fiel verglichen mit den Knoten (Abb. 11.2d, 11.2f) eine stärkere Expression auf. Interessanterweise ließ sich in den Fisteln der drei Patienten ein unterschiedliches Expressionsmuster beobachten. Während bei Patient 1 Involucrin nur eine leichte Expression aufwies (Abb. 11.3e), konnte bei Patient 6 eine stärkere Farbintensität nachgewiesen werden (Abb. 11.3f). Am höchsten war die Expression jedoch bei Patient 7 (Abb. 11.3g, 11.3h). Insgesamt war auffällig, dass in allen AI-Proben und in der Psoriasis die Expression in den tieferen Stratum spinosum-Schichten im Vergleich zu den darüber liegenden Epidermisschichten deutlich schwächer ausfiel.

Cytokeratin 10 als Marker der frühen Differenzierung wurde in gesunder Haut bereits in den tiefen Stratum spinosum-Schichten exprimiert (Abb. 11.1k). In der Psoriasis zeigte sich eine geringere Expression bei fehlender Färbung in der Basalzellschicht und einer verminderten Färbung im Stratum spinosum (Abb. 11.1l). Periläsional wurde Cytokeratin 10 zwar bereits vereinzelt im Stratum basale exprimiert, die Farbintensität in den tiefen Stratum spinosum-Schichten und damit die Expression fiel jedoch, mit der gesunden Haut verglichen, besonders bei Patient 6 und 7 deutlich schwächer aus (Abb. 11.1m-o). Ein ähnliches Verhalten konnte in den restlichen AI-Läsionen beobachtet werden: Auch in den Knoten (Abb. 11.2g, 11.2i) zeigte Cytokeratin 10 in den tieferen Stratum spinosum-Schichten eine schwächere Expression. In den Fisteln konnte die geringere Expression im Vergleich zur Normalhaut ebenfalls sehr deutlich beleuchtet werden (Abb. 11.3i-k).



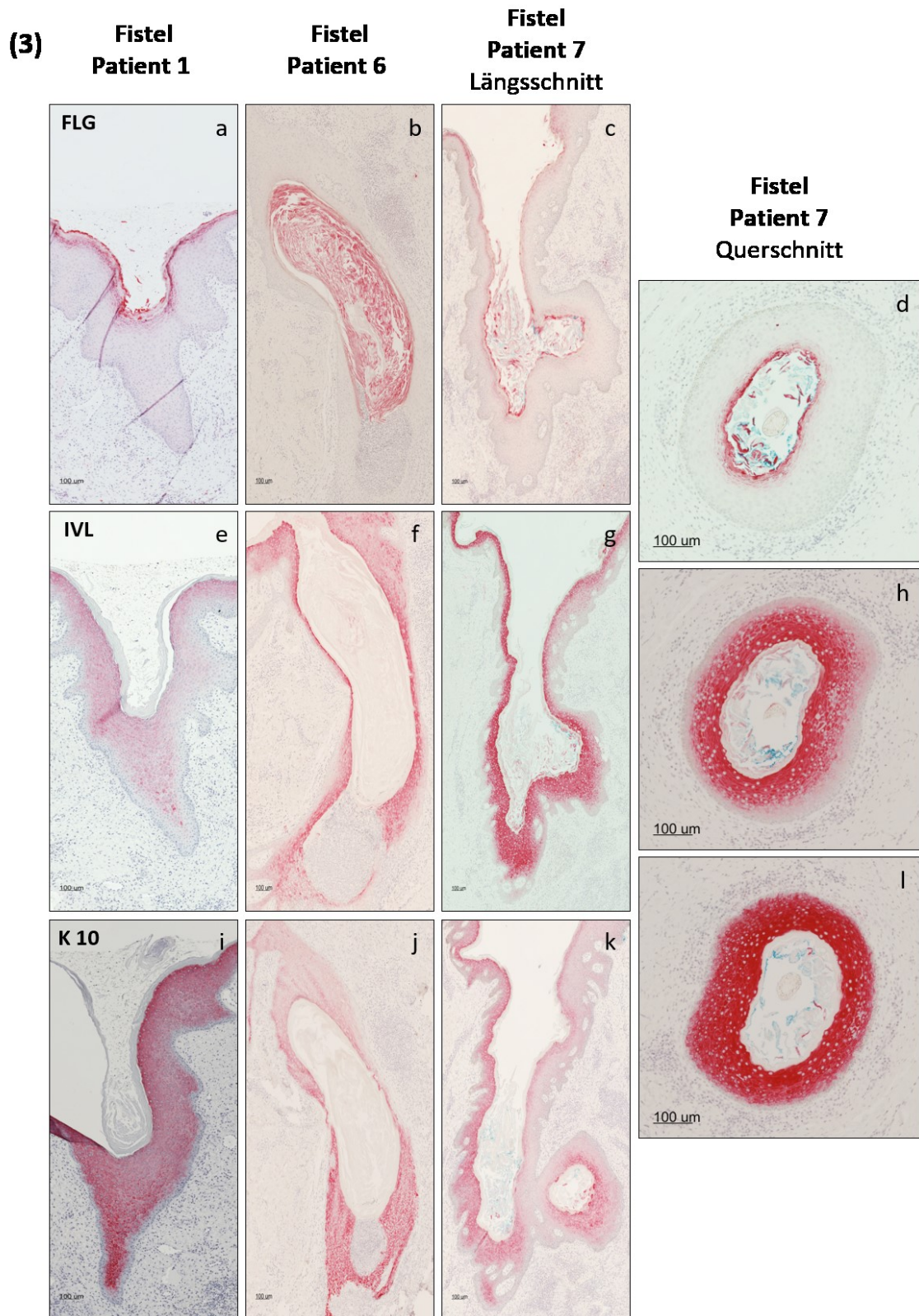


Abbildung 11: Aberrante Differenzierung in AI-Läsionen

Hautproben von gesundem Gewebe (Mamma) (1 a, f, k), psoriatischen Plaques (1 b, g, l) und periläsionaler (1 c, d, e, h, i, j, m, n, o) und läsionaler Haut (2 a-i; 3 a-l) von 10 AI-Patienten wurden mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Antikörpern gegen Filaggrin (FLG, 905801; BioLegend, San Diego, CA, USA) (1 a-e, 2 a-c, 3 a-d), Involucrin (IVL, sc-28557; Santa Cruz, Dallas, TX, USA) (1 f-j, 2 d-f, 3 e-h) und Cytokeratin 10 (K10, ab76318; Abcam, Cambridge, UK) (1 k-o, 2 g-i, 3 i-l) über Nacht immunhistochemisch

gefärbt. Zur Detektion wurde Histofine SimpleStain AP Multi (Nichirei Bioscience) verwendet und die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Zur Veranschaulichung ist hier anhand von drei Patientenbeispielen (Patient 1=gluteal, Patient 6=inguinal, Patient 7=axillär) das Verhalten der Differenzierungsmarker in unterschiedlichen AI-Läsionen dargestellt. Objektiv 10x, Balken = 100 µm

Für einen besseren Überblick über das gesamte Patientenkollektiv wurden die IHC-Färbungen von allen 10 Patienten quantitativ ausgewertet. Diese spiegeln das bereits beschriebene Verhaltensmuster der Differenzierungsmarker wider (Abb. 12). Sowohl gesunde Haut als auch die Psoriasis- und AI-Proben zeigten eine Expression von Filaggrin im Stratum granulosum und Stratum corneum (Abb. 12a). Filaggrin wurde als terminaler Differenzierungsmarker periläsional und in den Knoten außerdem bereits im Stratum spinosum exprimiert, was auf eine gestörte Differenzierung hinweist. Neben den Fisteln ließ sich auch in den entzündeten Knoten im Stratum granulosum im Vergleich zur gesunden Haut eine reduzierte Expression feststellen. In den übrigen AI-Proben war die Expression im Stratum corneum und Stratum granulosum zwar höher als in der gesunden Haut, jedoch geringer im Vergleich zur Psoriasis.

Involucrin als Marker der späten Differenzierung wurde in allen Proben sowohl im Stratum spinosum als auch im Stratum granulosum exprimiert (Abb. 12b). In den Knoten konnte als Zeichen einer aberranten Keratinozytendifferenzierung bereits im Stratum basale eine Expression detektiert werden. Darüber hinaus zeigte sich in einigen AI-Läsionen, wie in Fisteln, Knoten mit und ohne Entzündungszeichen und in entzündeten Läsionen auch eine Expression im Stratum corneum. Besonders auffällig war die Involucrin-Expression im Stratum spinosum der Fisteln im Vergleich zu den restlichen AI-Proben und zur gesunden Haut und Psoriasis. Im Stratum granulosum wurde Involucrin zwar stärker als in gesunder Haut, jedoch deutlich schwächer als in der Psoriasis exprimiert.

Cytokeratin 10 wurde in gesunder Haut in der gesamten Epidermis bis auf das Stratum corneum exprimiert, am stärksten jedoch in den suprabasalen Schichten (Abb. 12c). In der Psoriasis fehlte die Expression dagegen in der Basalzellschicht, konnte aber dafür im Stratum corneum detektiert werden. In allen AI-Hautproben bis auf die Fisteln wurde Cytokeratin 10 im Stratum basale exprimiert, am stärksten jedoch periläsional. Insgesamt und vor allem in den suprabasalen Schichten fiel die Expression jedoch, mit der gesunden Haut verglichen, schwächer aus. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich

in den AI-Läsionen eine aberranten Expression der Differenzierungsmarker Filaggrin, Involucrin und Cytokeratin 10 zeigte.

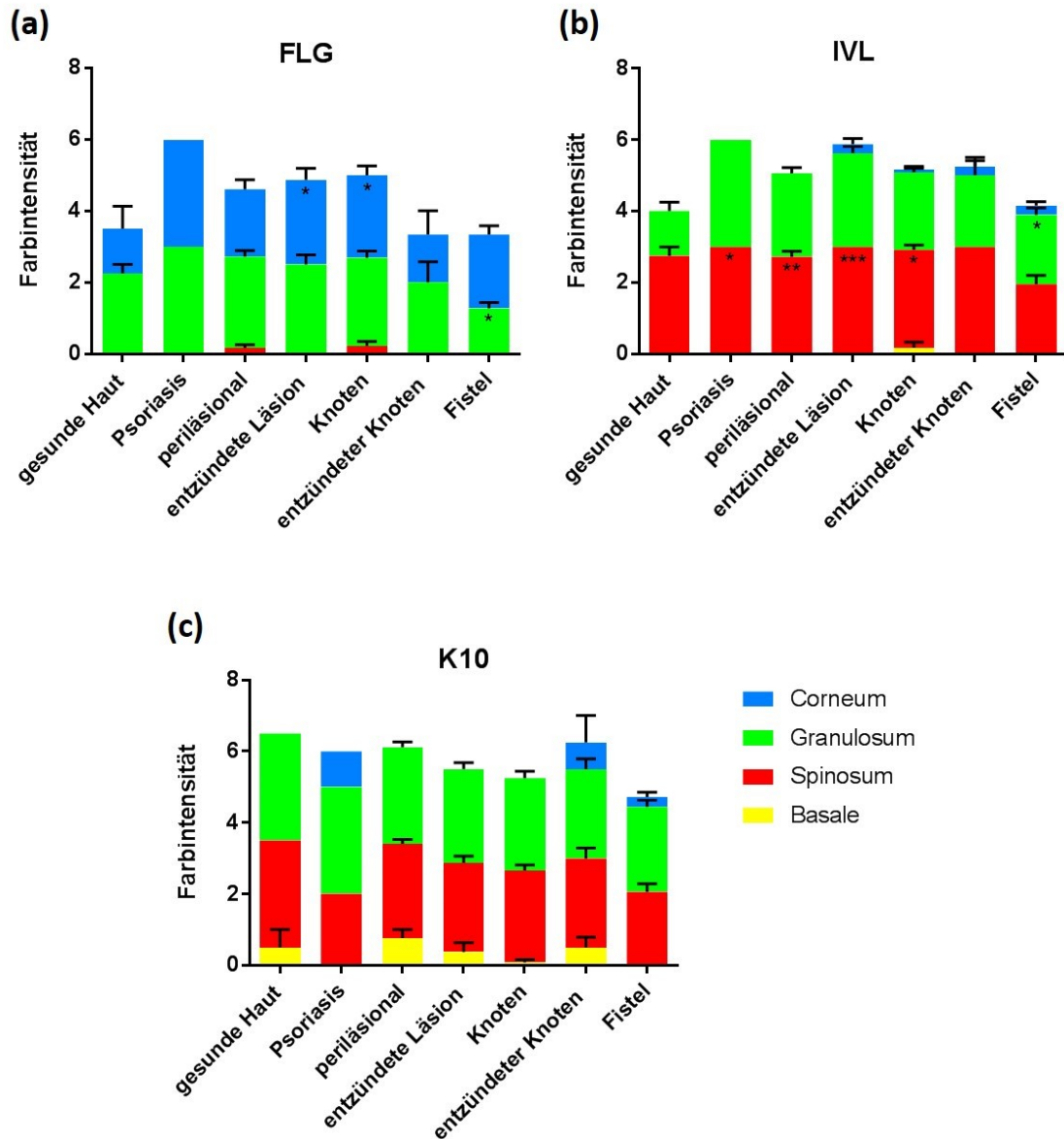


Abbildung 12: Acne inversa ist mit einer aberranten Expression der Differenzierungsmarker Filaggrin (FLG), Involucrin (IVL) und Cytokeratin 10 (K10) assoziiert

Quantitative Auswertung der Intensität der immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern spezifisch für Filaggrin (a), Involucrin (b) und Cytokeratin 10 (c) von gesunder Haut, psoriatischer Haut und Hautproben aller 10 AI-Patienten und ihre Verteilung innerhalb der einzelnen Epidermisschichten. Die Bewertung der Farbintensität erfolgte gemäß einer Skala von 0-3. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte +/- SEM. (a) Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Hautproben mit dem Antikörper gegen Filaggrin: gesunde Haut n=4, Psoriasis n=1, periläsional n=18, entzündete Läsion n=8, Knoten n=13, entzündeter Knoten n=3, Fistel n=18. (b) Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Hautproben mit dem Antikörper gegen Involucrin: gesunde Haut n=4, Psoriasis n=1, periläsional n=18, entzündete Läsion n=8, Knoten n=12, entzündeter Knoten n=4, Fistel n=19. (c) Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Hautproben mit dem Antikörper gegen Cytokeratin 10: gesunde Haut n=2, Psoriasis n=1, periläsional n=17, entzündete Läsion n=8, Knoten n=12, entzündeter Knoten n=4, Fistel n=18. Die statistische Signifikanz wurde mit zweiseitigem

ANOVA und Fisher's LSD Test im Verhältnis zum gesunden Gewebe berechnet (keine Angabe=nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

3.3 Untersuchung der Proliferations- und Entzündungsaktivität in Acne inversa-Läsionen

Um die Proliferationsaktivität in den AI-Läsionen beurteilen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen des Ki-67-Antigens durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Protein, welches in proliferierenden Zellen während aller aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Das Ki-67-Antigen kann sowohl im Zellkern gesunder Zellen als auch im Zellkern von Tumorzellen detektiert werden und stellt einen exzellenten Proliferationsmarker dar.¹²¹

Zum Aufzeigen der Entzündungsaktivität wurden T-Zellen mittels ihres Oberflächenmoleküls CD3 dargestellt. CD3 ist ein Korezeptor, der Teil des T cell receptor (TCR)-CD3-Komplexes ist und den besten Marker für reife T-Zellen darstellt.¹²² CD4+ - und CD8+- Lymphozyten stellen Untergruppen der CD3+-T-Zellen dar. Die CD3- und Ki-67-Färbungen sollten Aufschluss geben, ob in der AI ebenfalls wie in der Psoriasis vulgaris eine entzündungsvermittelte Aktivierung des mTOR-Signalwegs stattfindet, welche schließlich in einer gesteigerten Proliferation resultiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden anhand von 3 Patienten veranschaulicht (Abb. 13).

In gesundem Gewebe konnte keine Expression des Ki-67-Antigens nachgewiesen werden (Abb. 13.1a) und es fanden sich in der Dermis lediglich vereinzelt CD3+-Zellen (Abb. 13.1b). Die Psoriasishautproben zeigten große T-Lymphozyten-Infiltrate sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis (Abb. 13.1d). Gleichzeitig fanden sich in der Psoriasis viele Ki-67 positive Zellen, nicht nur im Stratum basale, sondern auch in den suprabasalen Zellschichten, was auf eine sehr starke Keratinozytenproliferation hindeutet (Abb. 13.1c). Insgesamt zeigten die AI-Läsionen eine höhere Proliferations- und Entzündungsaktivität im Vergleich zum gesunden Gewebe. Interessanterweise konnte in periläsionaler Haut von AI-Patienten ein unterschiedliches Verhaltensmuster beobachtet werden: Während Patient 6 eine niedrige CD3-Infiltration und nur wenige Ki-67 positive Zellen aufwies (Abb. 13.1e, 13.1f), zeigten die periläsionalen Hautproben von Patient 7 eine sehr starke CD3-Infiltration mit einer massiven Expression des Ki-67-Antigens (Abb. 13.1g, 13.1h). In AI-Läsionen wie im entzündeten Knoten

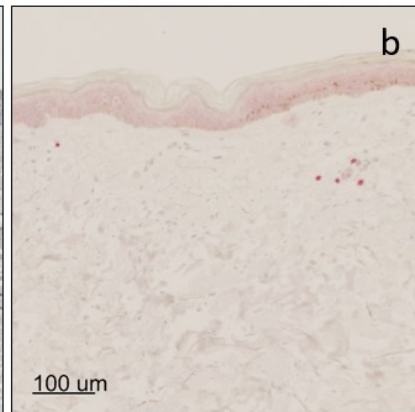
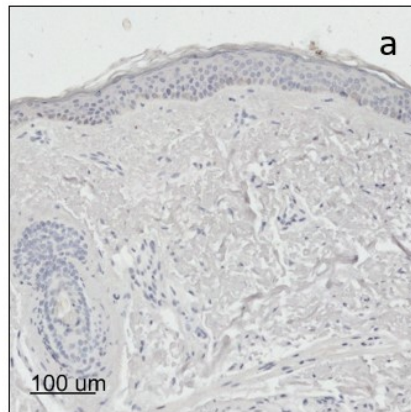
(Abb. 13.2a, 13.2b), im Knoten ohne Entzündungszeichen (Abb. 13.2e, 13.2f) und in der entzündeten Läsion (Abb. 13.2c, 13.2d) korrelierte das CD3-Infiltrat ebenfalls mit einer hohen Proliferationsrate. In den Fistelquerschnitten von Patient 7 (Abb. 13.3e, 13.3f) konnte man eindrucksvoll die dermale und epidermale Lymphozyteninfiltration und die basale und suprabasale Ki-67-Expression erkennen.

(1)

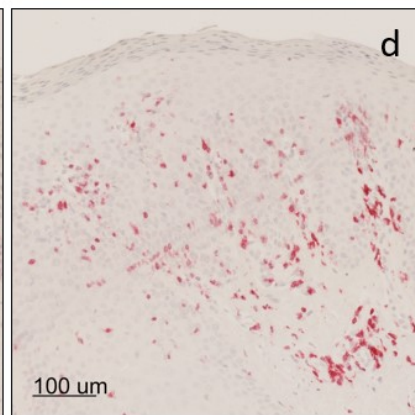
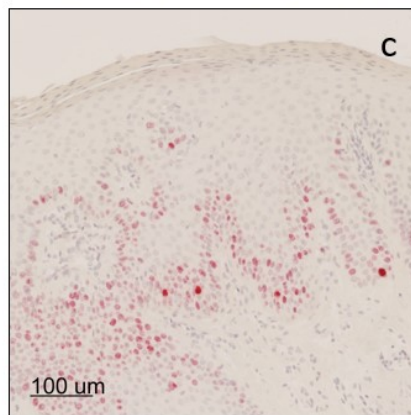
Ki -67

CD3

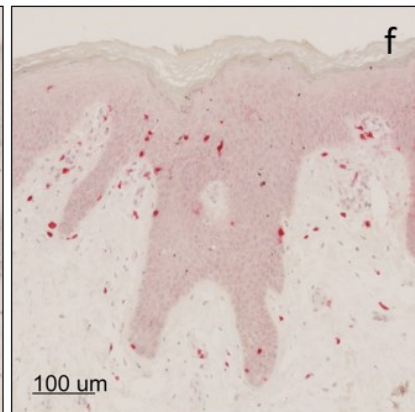
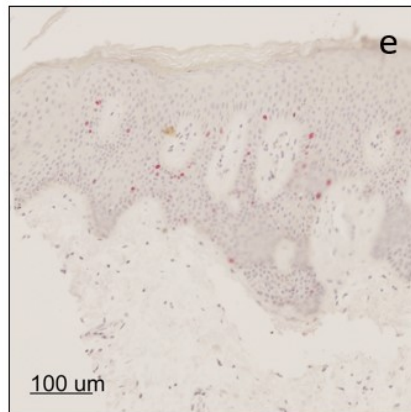
gesunde Haut



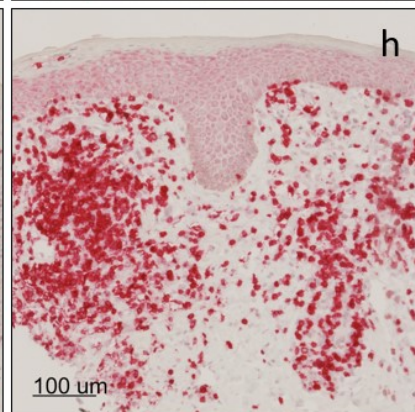
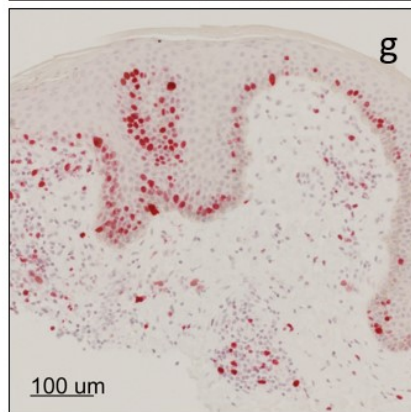
Psoriasis



**periläsional
Patient 6**



**periläsional
Patient 7**

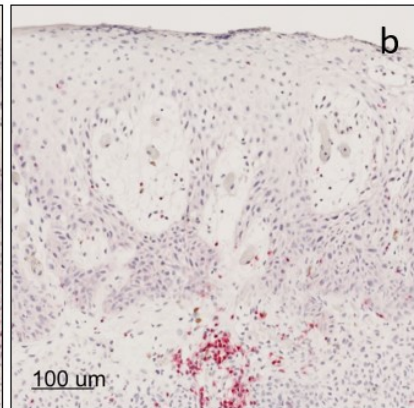
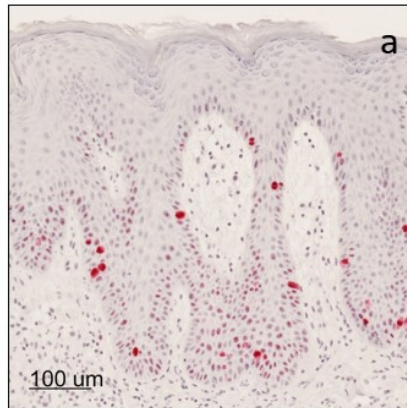


(2)

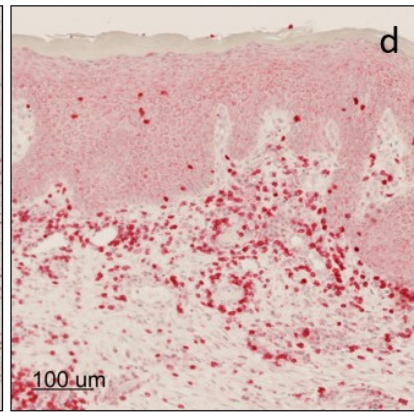
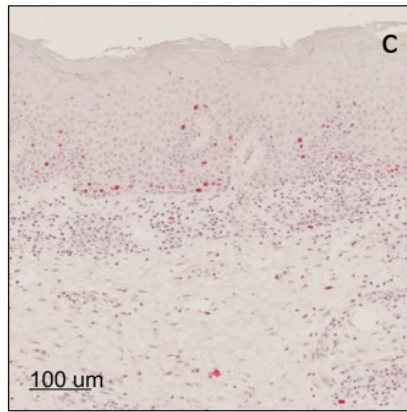
Ki -67

CD3

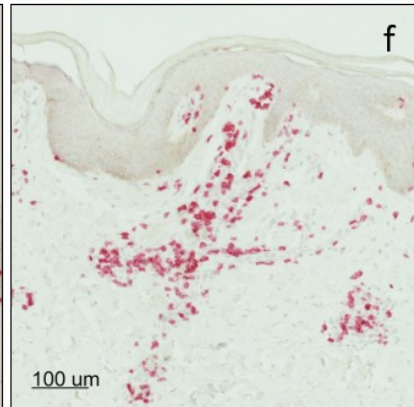
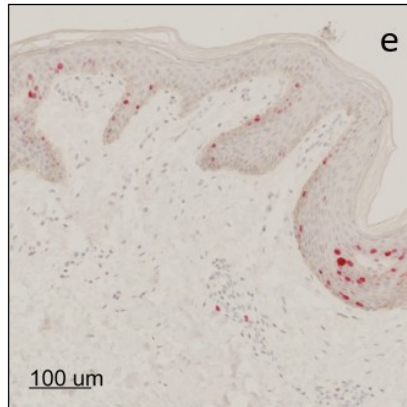
**entzündeter
Knoten
Patient 4**



**entzündete
Läsion
Patient 6**



**Knoten
Patient 7**

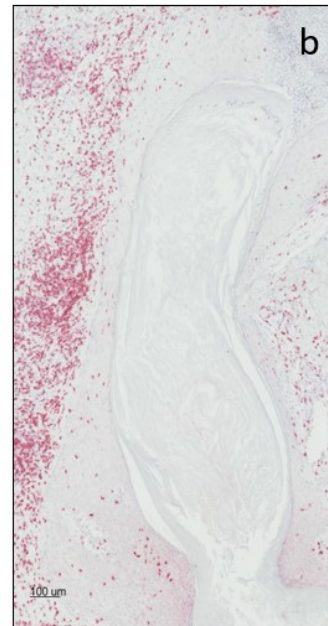
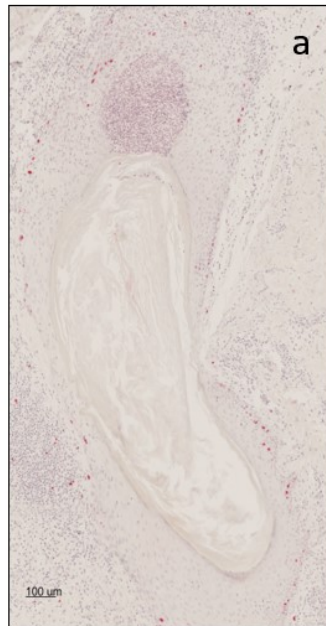


(3)

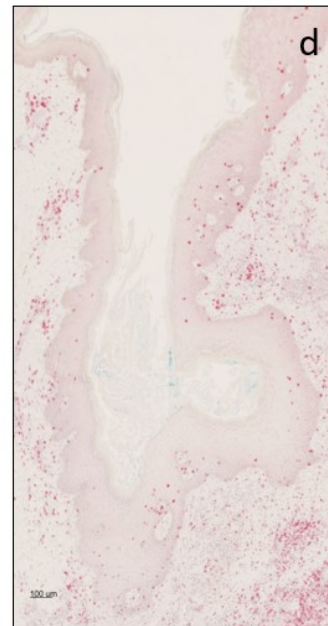
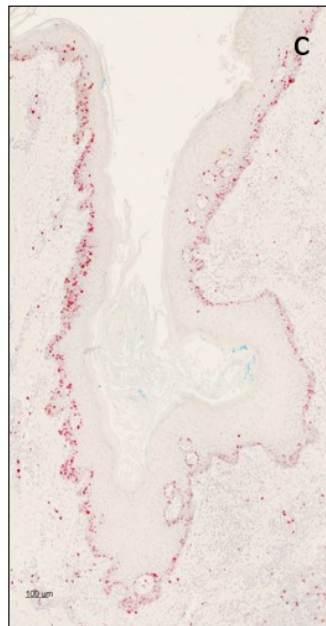
Ki-67

CD3

**Fistel
Patient 6**



**Fistel
Patient 7
Längsschnitt**



**Fistel
Patient 7
Querschnitt**

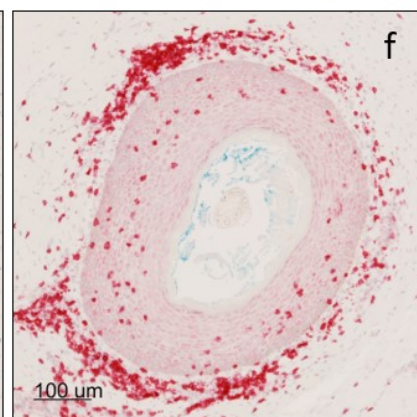
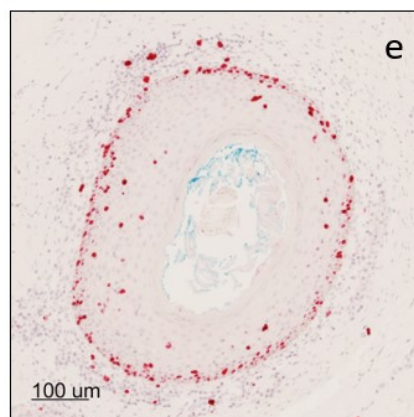


Abbildung 13: Massive Proliferation und starke Entzündung in den AI-Läsionen

Hautproben von gesundem Gewebe (Mamma) (1 a, b), psoriatischen Plaques (1 c, d) und periläsionaler (1 e-h) und läsionaler Haut (2 a-f; 3 a-f) von 10 AI-Patienten wurden mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Antikörpern gegen Ki-67 (Ki681R06; DCS Diagnostics, Hamburg, Germany) (1 a, c, e, g; 2 a, c, e; 3 a, c, e) und CD3 (AM322-5M; BioGenex, San Ramon, CA, USA) (1 b, d, f, h; 2 b, d, f; 3 b, d, f) über Nacht immunhistochemisch gefärbt. Zur Detektion wurde Histofine SimpleStain AP Multi (Nichirei Bioscience) verwendet und die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Zum besseren Vergleich wurden die Ki-67- und CD3-Färbungen gegenübergestellt, um zu zeigen, dass in Läsionen mit hoher Entzündungsaktivität eine hohe Proliferationsrate herrscht.

Zur Veranschaulichung ist hier anhand von drei Patientenbeispielen (Patient 4=axillär, Patient 6=inguinal, Patient 7=axillär) das Verhalten des Proliferationsmarkers Ki-67 und des Entzündungsmarkers CD3 in unterschiedlichen AI-Läsionen dargestellt. Objektiv 10x, Balken = 100 µm

Die quantitativen Auswertungen der immunhistologischen Färbungen aller Proben ergaben in beiden Dermatosen sowohl eine erhöhte Infiltration von CD3+-Zellen als auch eine gesteigerte Proliferationsrate (Abb. 14).

In der Epidermis aller AI-Proben konnte im Vergleich zur gesunden Haut eine gesteigerte Expression des Ki-67-Antigens festgestellt werden (Abb. 14a). In einigen Läsionen wie in den entzündeten Knoten und den Knoten ohne Entzündungszeichen konnten sogar mehr Ki-67 positive Zellen als in der Psoriasis detektiert werden. Die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen war in der AI in den entzündeten Knoten am höchsten, gefolgt von den Knoten ohne Entzündungszeichen und von den Fisteln (Abb. 14a). Periläsional fiel die Proliferationsrate von allen AI-Proben am geringsten aus.

Auch die Entzündungsrate war in der Acne inversa sehr hoch (Abb. 14b). Während in der gesunden Haut keine CD3-Infiltrate nachgewiesen werden konnten, wurden in der AI teilweise mehr CD3+-Zellen als in der Psoriasis detektiert. Wie beim Proliferationsmarker Ki-67, war die CD3-Infiltration in den entzündeten Knoten am höchsten, gefolgt von den Fisteln und entzündeten Läsionen. Periläsional zeigte sich im Vergleich zu den restlichen AI-Proben eine geringere Entzündung (Abb. 14b).

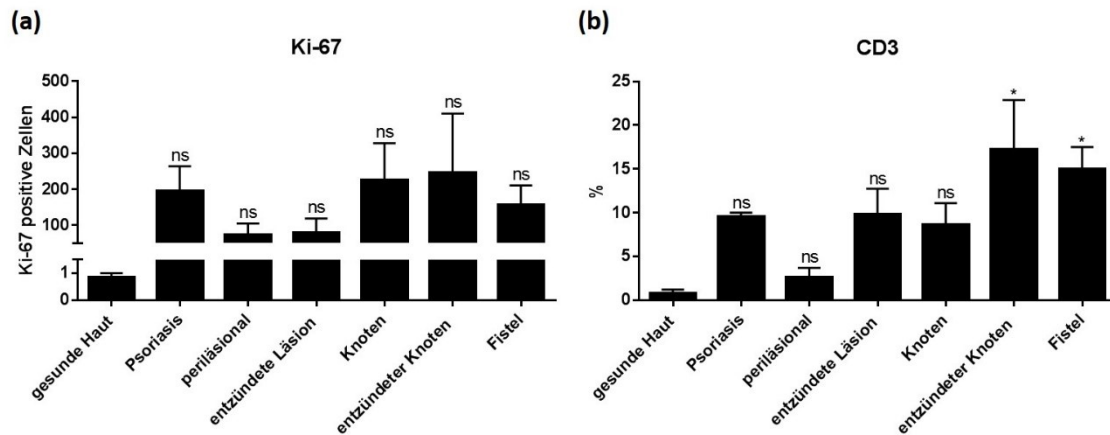


Abbildung 14: Gesteigerte Proliferations- und Entzündungsrate in der Acne inversa

Quantitative Auswertung der Ki-67 positiven Zellen innerhalb der Epidermis und des Entzündungsmarkers CD3 innerhalb der Dermis von gesunder Haut, psoriatischer Haut und Hautproben aller 10 AI-Patienten. Zur Auswertung Ki-67 positiver Zellen wurde eine gleich große Fläche definiert (1500 px x 4500 px) und innerhalb dieser wurden die gefärbten Zellkerne mittels NIS-Elements gezählt. Zur quantitativen Auswertung des Entzündungsmarkers CD3 wurde innerhalb der definierten Fläche (1500 px x 4500 px) der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche berechnet, indem die gefärbten Areale markiert und zur Gesamtfläche ins Verhältnis gesetzt wurden. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte +/-SEM.

(a) Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Hautproben mit dem Antikörper gegen Ki-67: gesunde Haut n=6, Psoriasis n=5, periläsional n=18, entzündete Läsion n=7, Knoten n=11, entzündeter Knoten n=4, Fistel n=17. (b) Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Hautproben mit dem Antikörper gegen CD3: gesunde Haut n=4, Psoriasis n=5, periläsional n=16, entzündete Läsion n=8, Knoten n=11, entzündeter Knoten n=4, Fistel n=17. Die statistische Signifikanz wurde mit einseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test im Verhältnis zum gesunden Gewebe berechnet (ns=nicht signifikant, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001)

3.4 Untersuchung der Signalkaskade downstream von mTOR

3.4.1 *In-vitro*-Untersuchung der Signalkaskade downstream von mTOR

Buerger *et al.* haben gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine die mTOR-Kinase, PRAS40 und die nachgeschalteten Effektormoleküle S6 und 4E-BP1 aktivieren.⁹⁷ Um die bereits bekannte zytokinvermittelte Aktivierung des PI3-K/Akt/mTOR-Signalwegs zu demonstrieren, wurden HaCaT-Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL-1 β , IL-17A und IL-22 stimuliert, welche bei der Pathogenese der Psoriasis vulgaris und potentiell auch in der Acne inversa eine Rolle spielen.^{38,116} Die Wirkung der Zytokine auf den genannten Signalweg wurde sowohl einzeln als auch in unterschiedlichen Kombinationen untersucht (Abb. 15a, 15b). Die Ergebnisse zeigten, dass in HaCaT-Zellen TNF- α und IL-1 β , jedoch nicht IL-17A, zu einer deutlichen

Aktivierung des mTORC1-Signalwegs führen. Besonders der Mix aus den drei Zytokinen induzierte eine deutliche Phosphorylierung von PKB und S6 (Abb. 15a, 15b). Der Effekt von IL-22 und IL-22 in Kombination mit IL-17A fiel deutlich schwächer aus (Abb. 15b). Zusätzlich gaben die Ergebnisse des Western Blots Hinweise über die Interaktion des mTOR- und JAK/STAT-Signalwegs. Es ist bekannt, dass der mTORC1-Komplex STAT3 an S727 in verschiedenen Zellmodellen phosphorylieren kann,¹⁰⁷ dies konnte auch an den HaCaT-Zellen demonstriert werden. Besonders die Stimulation der HaCaT-Zellen mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 β und dem Mix führte zu einer deutlichen Phosphorylierung von STAT3 am Serinrest (Abb. 15a, 15b). Auch die Kombinationen von TNF- α mit IL-1 β , von TNF- α mit IL-17A und von IL-1 β mit IL-17A führten zu einer STAT3-S727-Aktivierung. IL-22 allein und in Kombination mit anderen Zytokinen konnte lediglich eine schwache Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3-S727 erzielen (Abb. 15b).

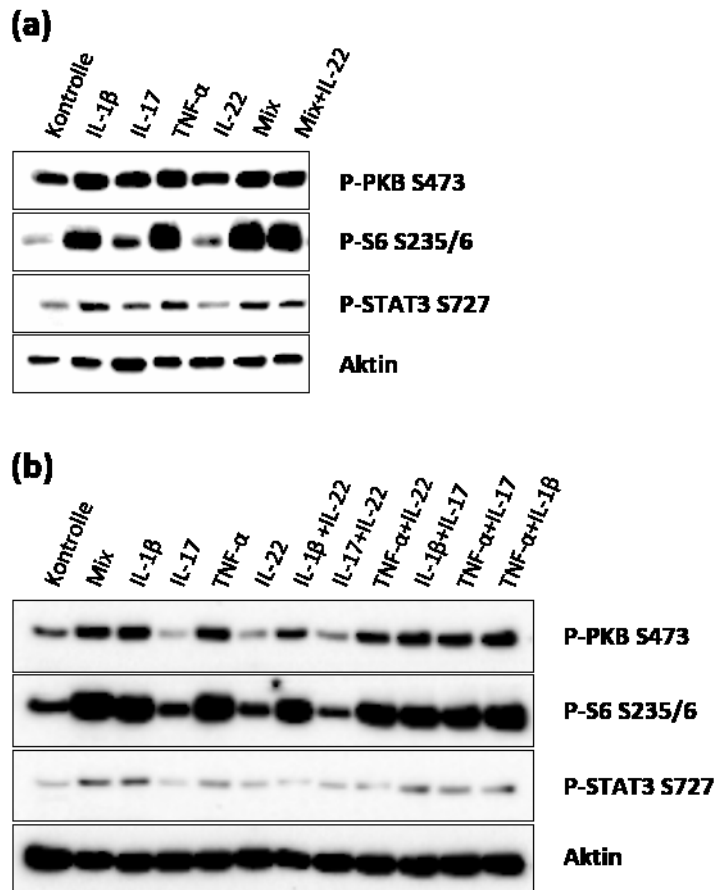


Abbildung 15: TNF- α , IL-1 β und Mix (IL-1 β , TNF- α , IL-17A) induzieren in HaCaT-Zellen die Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 und die Phosphorylierung von STAT3 an S727 über den PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg

Nach Kultivierung in Mangelmedium wurden HaCaT-Zellen 30 min mit den gezeigten Zytokinen stimuliert (IL-1 β 20 ng/ml, TNF- α 0.2 ng/ml, IL-22 20 ng/ml, IL-17A 20 ng/ml). Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt, die Proteine mittels Gelelektrophorese getrennt, beim Western Blot auf eine Membran übertragen und mit entsprechenden Antikörpern visualisiert. Mix=IL-1 β , TNF- α , IL-17A

mTOR ist eine Serin/Threonin-Kinase, die durch das immunsuppressiv wirkende Rapamycin inhibiert werden kann. Rapamycin bindet dabei selektiv an den mTORC1-Komplex und hemmt diesen, nach längerer Behandlung kann Rapamycin in einigen Zelltypen jedoch auch mTORC2 blockieren.⁹⁴ Außer der Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen, wurden die Zellen mit Rapamycin und Tofacitinib, einem JAK1 und JAK3 Inhibitor,¹⁰² behandelt, um die Beteiligung der gehemmten Kinase auf den Signalweg zu beleuchten (Abb. 16). Durch die Stimulation der HaCaT-Zellen mit dem Mix konnte eine starke Phosphorylierung von PKB, mTOR und S6 beobachtet werden. Außerdem zeigte die Western-Blot-Analyse erneut eine durch den Mix induzierte Phosphorylierung

von STAT3 am Serinrest. Bei Kombination von Rapamycin und dem Mix war zwar eine Phosphorylierung von mTOR, S6 und STAT3-S727 erkennbar, diese fiel jedoch deutlich schwächer aus im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit den jeweiligen Zytokinen. Der alleinige Einsatz von Rapamycin führte neben einer reduzierten Phosphorylierung von PKB, mTOR und S6 außerdem zu einer fehlenden Aktivierung von STAT3 am Serinrest, was einen Hinweis darauf gibt, dass mTORC1 für dessen Phosphorylierung verantwortlich sein könnte.

Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass STAT3 nach Stimulation der Zellen mit IL-22 am Y705-Rest phosphoryliert wurde (Abb. 16). Durch Tofacitinib wurde diese Phosphorylierung gehemmt. Der mTORC1-Inhibitor Rapamycin hatte nach zuvor erfolgter Stimulation der Zellen mit IL-22 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung am Y705-Rest, Tofacitinib führte dagegen zu einer abgeschwächten Phosphorylierung.

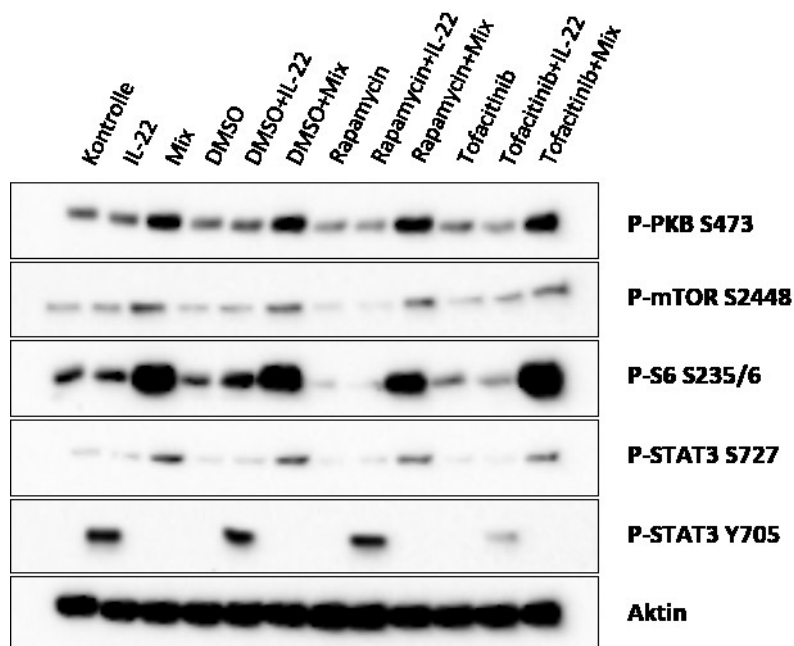


Abbildung 16: IL-22 induziert in HaCaT-Zellen die Phosphorylierung von STAT3 an Y705 über den JAK/STAT3-Signalweg. Rapamycin hemmt die zytokinvermittelte Phosphorylierung von mTOR, S6 und STAT3-S727

Nach Kultivierung in Mangelmedium wurden HaCat-Zellen zunächst für 30 min mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle) und den Inhibitoren Rapamycin (100 μ M) und Tofacitinib (50 nM) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 30 min mit den gezeigten Zytokinen stimuliert (IL-1 β 20 ng/ml, TNF- α 0.2 ng/ml, IL-22 20 ng/ml, IL-17A 20 ng/ml). Daraufhin wurden Proteinlysate hergestellt, die Proteine mittels Gelelektrophorese getrennt, beim Western Blot auf eine Membran übertragen und mit entsprechenden Antikörpern visualisiert. Mix=IL-1 β , TNF- α , IL-17A

3.4.2 Untersuchung der Signalkaskade downstream von mTOR in Acne inversa-Läsionen

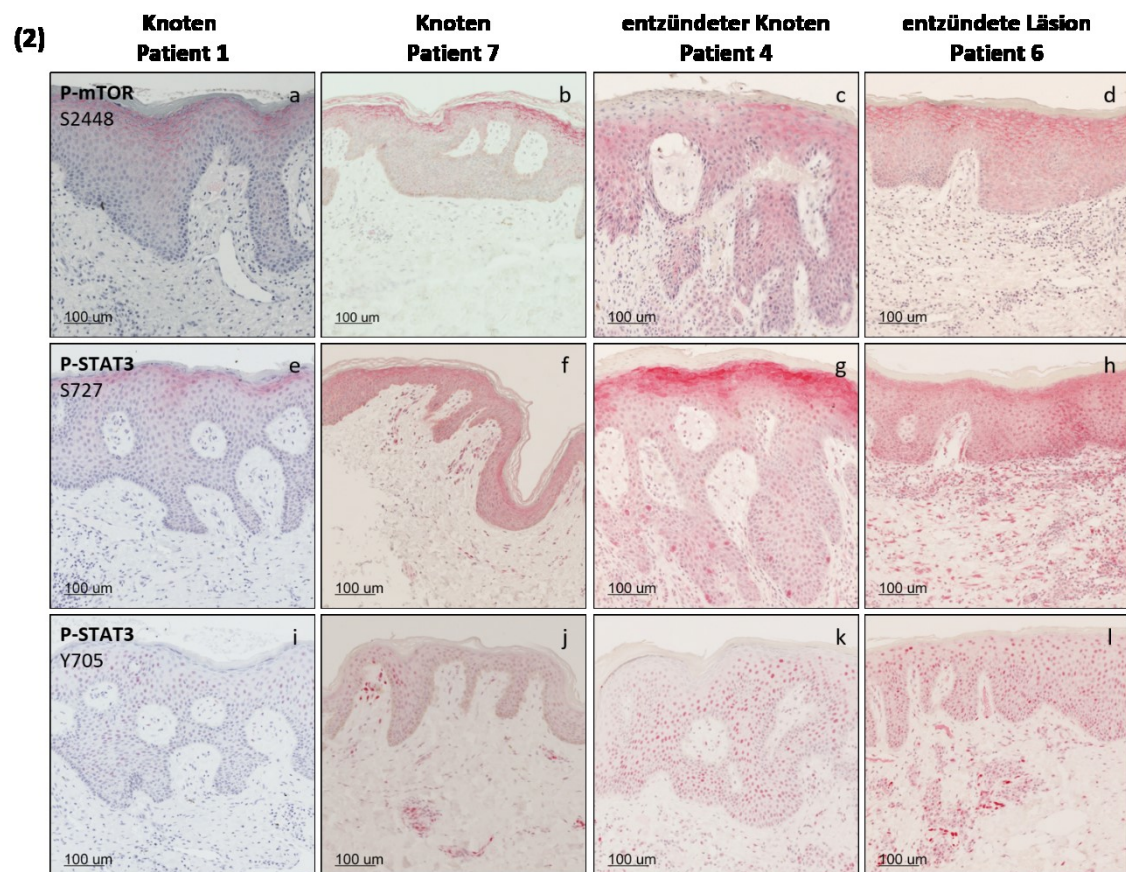
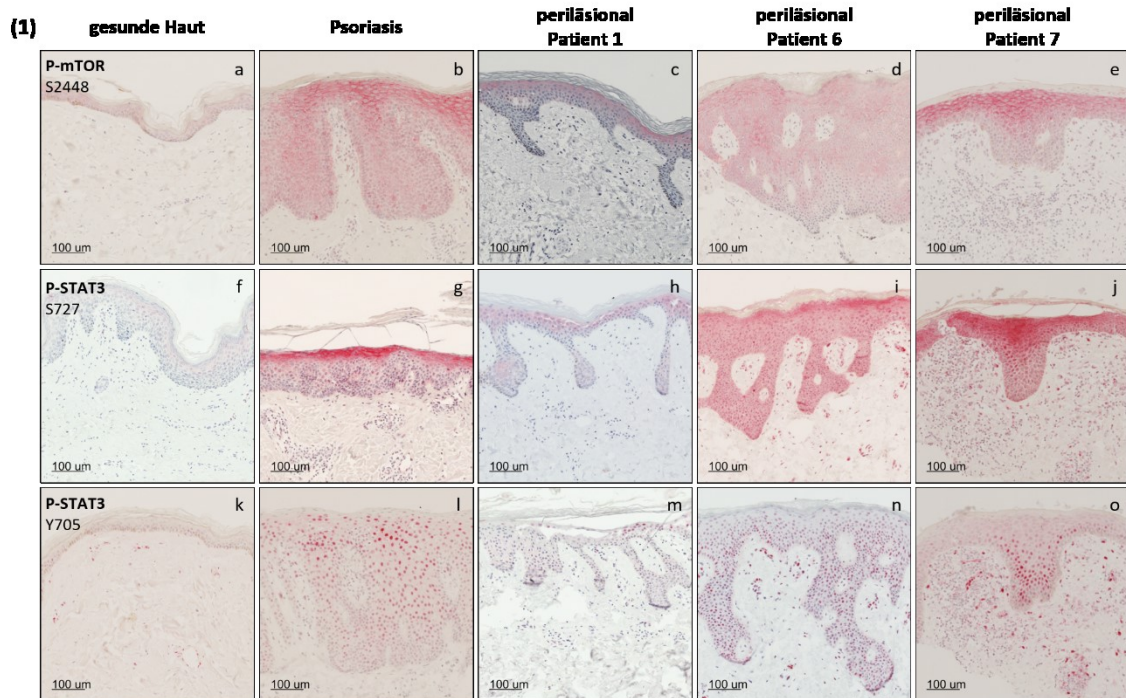
Die durchgeführten Western-Blot-Analysen deuteten die Interaktion zwischen mTOR- und JAK/STAT3-Signalweg an: Der mTOR-Inhibitor Rapamycin führte zu einer fehlenden Aktivierung von STAT3 am Serinrest. Um zu untersuchen, ob auch der JAK/STAT3-Signalweg in der AI dereguliert ist und eine Interaktion mit dem mTOR-Signalweg vorliegt, wurden die Hautproben mit Antikörpern gegen P-STAT3-S727 und P-STAT3-Y705 gefärbt. P-STAT3-S727 wurde sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert. Anti-P-STAT3-Y705 reichte sich dagegen lediglich im Zellkern der Hautproben an, da die Phosphorylierung an Y705 essenziell für die STAT3-Dimerbildung und damit die Kerntranslokation sowie die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bindungsaktivität ist.¹²³ Die Ergebnisse werden im Folgenden anhand von 4 Patienten veranschaulicht (Abb. 17).

Das gesunde Mammagewebe zeigte lediglich vereinzelt P-STAT3-Y705 positive Zellen (Abb. 17.1k), in der Psoriasis waren sie über der gesamten Epidermis verstreut (Abb. 17.1l). In der AI waren P-STAT3-Y705 positive Zellen periläsional ebenfalls bis auf das Stratum corneum über der ganzen Epidermis verteilt (Abb. 17.1m-o), wobei auch in der Dermis vereinzelt P-STAT3-Y705 positive Zellen vorkamen. Es fiel auf, dass bei Patient 1 STAT3-Y705 vor allem in den oberen, bei Patient 7 dagegen in unteren Epidermisschichten phosphoryliert wurde (Abb. 17.1m, 17.1o). Die STAT3-Y705-Aktivität in der AI stieg mit dem Entzündungsgrad der Läsionen. In einem entzündeten Knoten von Patient 4 (Abb. 17.2k) bzw. einer entzündeten Läsion von Patient 6 (Abb. 17.2l) war die Phosphorylierung und damit auch die Aktivität stärker als in den Knoten ohne Entzündungszeichen (Abb. 17.2i,17.2j). Während STAT3-Y705 in der Epidermis der Fistel von Patient 1 gar nicht phosphoryliert wurde (Abb. 17.3i), zeigte sich bei Patient 6 eine massive Aktivität (Abb. 17.3j). In der Fistel von Patient 7 kam P-STAT3-Y705 vor allem in der Dermis vor (Abb. 17.3k, 17.3l).

In gesunder Haut konnte nahezu kein P-STAT3-S727 detektiert werden (Abb. 17.1f). In der Psoriasis dagegen konnte eine kontinuierliche Färbung entlang des Stratum granulosum und des oberen Stratum spinosum beobachtet werden, wobei auch in den darunterliegenden Schichten vereinzelt P-STAT3-S727 positive Keratinozyten auftraten (Abb. 17.1g). Interessanterweise konnte in den

periläsionalen Proben der AI-Patienten eine unterschiedliche STAT3-S727-Aktivität beobachtet werden. Während STAT3-S727 bei Patient 6 und 7 in der gesamten Epidermis hyperaktiviert war (Abb. 17.1i, 17.1j), trat der Transkriptionsfaktor in seiner phosphorylierten Form bei Patient 1 lediglich im Stratum granulosum und oberem Stratum spinosum auf (Abb. 17.1h). Bei Patient 6 und 7 war die Aktivität ähnlich wie in der Psoriasis in den oberen Epidermisschichten am höchsten. In den Knoten ohne Entzündungszeichen (Abb. 17.2e, 17.2f) konnte im Vergleich zur Psoriasis eine geringere STAT3-S727-Aktivität beobachtet werden, nichtsdestotrotz zeigte sich eine unterschiedliche STAT3-Aktivität bei beiden Patienten. Während sich die Aktivität bei Patient 1 lediglich auf das Stratum granulosum und das obere Stratum spinosum beschränkte (Abb. 17.2e), war STAT3-S727 bei Patient 7 sowohl im Stratum basale als auch in den suprabasalen Schichten hyperaktiviert (Abb. 17.2f). Mit zunehmender Entzündung stieg die Phosphorylierung von STAT3-S727 (Abb. 17.2g, 17.2h) und konnte im entzündeten Knoten und der entzündeten Läsion sowohl basal als auch suprabasal detektiert werden. In den Fisteln kam STAT3-S727 in phosphorylierter Form ebenfalls in den oberen Epidermisschichten, im Stratum granulosum und oberem Stratum spinosum, gehäuft vor (Abb. 17.3e-h). Ähnlich wie in den periläsionalen Proben (Abb. 17.1h-j) konnte auch in den Fisteln eine unterschiedliche STAT3-S727-Aktivität beobachtet werden. Während STAT3-S727 bei Patient 6 und 7 in der gesamten Epidermis hyperaktiviert war (Abb. 17.3f-h), trat STAT3 in seiner phosphorylierten Form bei Patient 1 (Abb. 17.3e) lediglich im Stratum granulosum und oberem Stratum spinosum auf.

Insgesamt zeigten die immunhistologischen Färbungen, dass die mTOR-Aktivität mit der STAT3-S727-Aktivität korreliert. Sowohl mTOR als auch STAT3-S727 zeigten in den AI-Proben die stärkste Aktivität im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum.



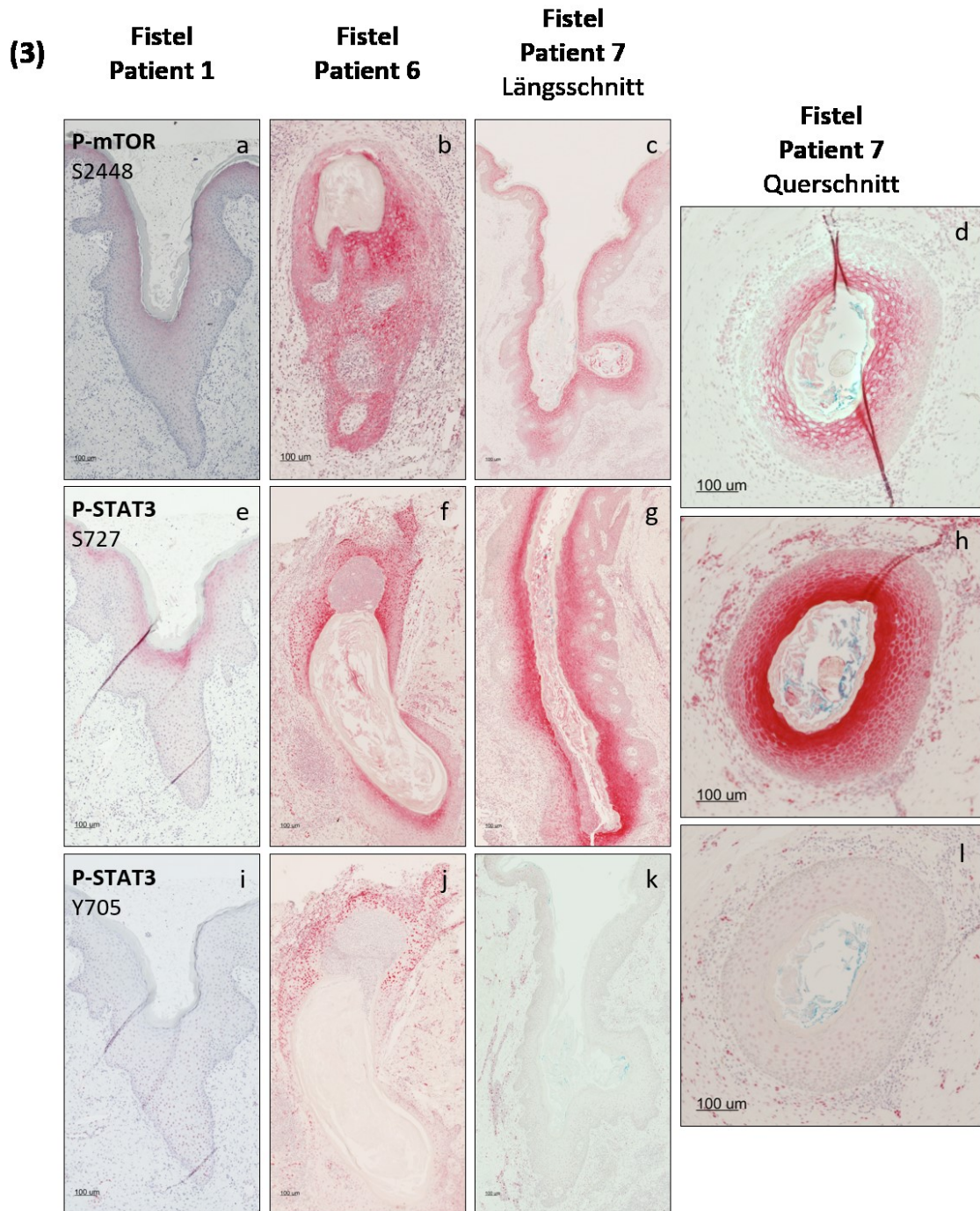


Abbildung 17: Erhöhte m-TOR- und STAT3-S727-Aktivität in den oberen Epidermisschichten in der AI

Hautproben von gesundem Gewebe (Mamma, Präputium) (1 a, f, k), psoriatischen Plaques (1 b, g, l) und periläsionaler (1 c, d, e, h, i, j, m, n, o) und läsionaler Haut (2 a-l; 3 a-l) von 10 AI-Patienten wurden mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Antikörpern gegen P-mTOR S2448 (#2976, CellSignaling) (1 a-e, 2 a-d, 3 a-d), P-STAT3-S727 (#9134, CellSignaling) (1 f-j, 2 e-h, 3 e-h) und P-STAT3-Y705 (#9145, CellSignaling) (1 k-o, 2 i-l, 3 i-l) über Nacht immunhistochemisch gefärbt. Zur Detektion wurde Histofine SimpleStain AP Multi (Nichirei Bioscience) verwendet und die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Zur Veranschaulichung ist hier anhand von 4 Patientenbeispielen (Patient 1=gluteal, Patient 4=axillär, Patient 6=inguinal, Patient 7=axillär) die Aktivität von mTOR, STAT3-S727 und STAT3-Y705 in unterschiedlichen AI-Läsionen dargestellt. Objektiv 10x, Balken = 100 µm

Die quantitativen Auswertungen zeigten eine erhöhte Phosphorylierung von STAT3-S727 und STAT3-Y705 in der AI und Psoriasis vulgaris (Abb. 18). In gesunder Haut wurde P-STAT3-S727 lediglich im Stratum spinosum, Stratum granulosum und in sehr schwacher Ausprägung im Stratum basale nachgewiesen (Abb. 18b). STAT3-S727 war in nahezu allen AI-Proben in der gesamten Epidermis hyperaktiviert, am stärksten jedoch im Stratum spinosum und Stratum granulosum. Im Vergleich dazu konnte in der Psoriasis vulgaris eine Aktivierung lediglich im Stratum spinosum und Stratum granulosum beobachtet werden. Auffällig war die hohe STAT3-S727-Aktivierung in den entzündeten Läsionen, gefolgt von den Fisteln und periläsionalen Hautproben.

Die quantitativen Auswertungen zeigten deutlich, wie die STAT3-Y705-Phosphorylierung in der AI mit dem Entzündungsgrad der Läsionen anstieg (Abb. 18a). In einem entzündeten Knoten bzw. einer entzündeten Läsion konnte eine stärkere Phosphorylierung als in einem Knoten ohne Entzündungszeichen beobachtet werden. In der AI war die Zahl der P-STAT3-Y705 positiven Zellen an Orten hoher Entzündung sogar höher als in der Psoriasis. Dieses Verhaltensmuster konnte dabei sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis beobachtet werden, wobei in der Dermis insgesamt weniger Kernfärbungen zu finden waren.

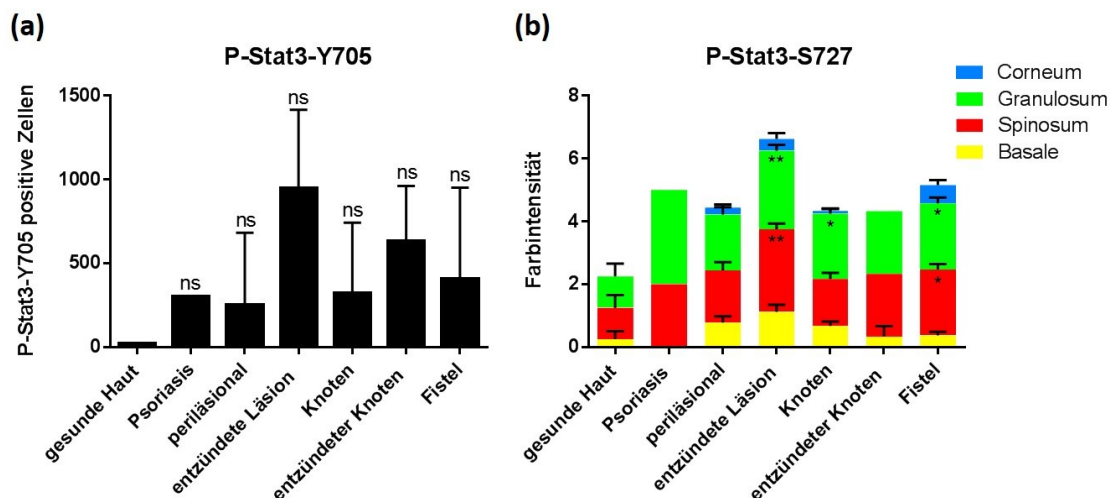


Abbildung 18: Erhöhte Aktivität von STAT3-Y705 und STAT3-S727 in der Acne inversa

Quantitative Auswertung der P-STAT3-Y705 positiven Zellen in der Epidermis (a) und der Intensität der immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper spezifisch für P-STAT3-S727 (b) und seine Verteilung innerhalb der einzelnen Epidermisschichten von gesunder Haut, psoriatischer Haut und Hautproben aller 10 AI-Patienten. Zur Auswertung P-STAT3-Y705 positiver Zellen wurde eine gleich große Fläche definiert (1500 px x 4500 px), innerhalb dieser wurden die gefärbten Zellkerne mittels NIS-Elements gezählt. Die Bewertung der Farbintensität erfolgte gemäß einer Skala von 0-3. Dargestellt sind jeweils

Mittelwerte +/-SEM.

(a) Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Hautproben mit dem Antikörper gegen P-STAT3-Y705: gesunde Haut n=1, Psoriasis n=1, periläsional n=18, entzündete Läsion n=7, Knoten n=12, entzündeter Knoten n=4, Fistel n=17. Die statistische Signifikanz wurde mit einseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test im Verhältnis zum gesunden Gewebe berechnet. (b) Anzahl der immunhistochemisch gefärbten Hautproben mit dem Antikörper gegen P-STAT3-S727: gesunde Haut n=4, Psoriasis n=1, periläsional n=18, entzündete Läsion n=8, Knoten n=12, entzündeter Knoten n=3, Fistel n=19. Die statistische Signifikanz wurde mit zweiseitigem ANOVA und Fisher's LSD Test im Verhältnis zum gesunden Gewebe berechnet (keine Angabe/ns=nicht signifikant, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001)

4 Diskussion

4.1 Die Rolle des mTORC1-Signalwegs in der Acne inversa

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des mTORC1-Signalwegs bei der Entstehung sowie Aufrechterhaltung der entzündlichen Prozesse im Rahmen der AI zu untersuchen.

Im Vergleich zur gesunden Haut konnte sowohl in läsionaler als auch periläsionaler Haut von AI-Patienten eine massive mTOR- und S6-Aktivität detektiert werden (Abb. 10). Die mTOR-Aktivität war im Vergleich zu den Psoriasis-Proben sogar teilweise stärker, vor allem im Stratum basale. Ebenfalls sehr auffällig war die starke Aktivität in periläsionalen Hautproben im Vergleich zu AI-Läsionen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit bestätigen die bisher gewonnenen Ergebnisse aus früheren Studien, in welchen eine erhöhte mTOR-Expression in der AI gezeigt werden konnte. G. Monfrecola *et al.* stellten eine erhöhte mTOR-Expression sowohl in läsionaler als auch in nicht-läsionaler Haut von AI Patienten fest, die Expressionsstärke korrelierte dabei mit dem Schweregrad der Erkrankung.¹²⁴ Während in den periläsionalen AI-Proben nur wenige Ki-67+- und CD3+- Zellen detektiert werden konnten (Abb. 14), zeigten die AI-Läsionen wie entzündete Knoten oder Fisteln sowohl eine erhöhte Infiltration von CD3+-Zellen als auch eine gesteigerte Proliferationsrate. Schaut man sich die unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen an, so erkennt man eine Tendenz: Gerade an Stellen hoher Entzündung korreliert sowohl in AI-Läsionen als auch in den Psoriasisproben die erhöhte mTOR-Aktivität mit einer gestörten Differenzierung und einer gesteigerten Proliferation. Aus den Ergebnissen dieser Thesis lässt sich schlussfolgern, dass womöglich die Aktivierung des mTORC1-Signalwegs durch proinflammatorische Zytokine

(Abb. 15, 16) die Keratinozytenproliferation triggert und zur Pathogenese der AI beiträgt. In verschiedenen Studien wurden in den AI-Hautproben erhöhte Konzentrationen von Zytokinen IL-17A, TNF- α und IL-1 β nachgewiesen, die bekanntlich den mTORC1-Signalweg aktivieren.^{91,118} Die Hypothese, dass diese Zytokine für die Aktivierung des mTORC-Signalwegs in der Acne inversa verantwortlich sind, wird durch die erfolgsversprechende AI-Behandlung mit TNF- α -Blockern gestützt. Um den Circulus vitiosus der AI zu durchbrechen, werden bereits anti-inflammatorische Substanzen, wie zum Beispiel das Biologikum Adalimumab, eingesetzt. Balato *et al.* untersuchten mittels Immunfluoreszenz die Expression von S6 und P-S6 vor und nach einer 16-wöchigen Adalimumab-Behandlung in AI-Hautproben und stellten in Woche 0 eine starke Anfärbung des Proteins und seiner phosphorylierten Form fest, in Woche 16 war diese deutlich geringer. Dies lässt sich anhand der mTORC1-Aktivierung durch TNF- α erklären: Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKK β) ist eine wichtige nachgeschaltete Kinase im TNF- α -Signalweg, eine IKK β -vermittelte Phosphorylierung und Inaktivierung von TSC1 führt schließlich zu einer Aktivierung von mTORC1.¹²⁵⁻¹²⁸ Durch den Einsatz von TNF- α -Inhibitoren wird diese Wirkung aufgehoben und mTORC1 inaktiviert. In einer weiteren Studie wurden 12 AI-Patienten im Hurley-Stadium II und III eingeschlossen und 1 Jahr mit Adalimumab behandelt. Bei 9 Patienten konnte nach einem Jahr neben einem signifikanten klinischen Therapieansprechen eine signifikante Besserung der Lebensqualität beobachtet werden.¹²⁹ Ähnliche Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie mit 23 AI-Patienten erzielt werden. Zu Beginn der Studie betrug der IHS4-Mittelwert 6.2 Punkte, was einer moderaten Erkrankung entspricht. Mit dem IHS4 werden die Anzahl und die Art der Läsionen erfasst. Für jeden entzündlichen Knoten wird 1 Punkt, für jeden Abszess 2 Punkte und für jede Fistel 4 Punkte vergeben.²¹ Nach einjähriger Adalimumab-Behandlung konnte auch hier eine signifikante Besserung des Hautbefundes erzielt werden, der IHS4-Mittelwert betrug 2 Punkte.¹³⁰

Wie bereits erwähnt, löst in der AI die perifollikuläre Entzündung eine Hyperkeratose mit Verschluss des oberen Haarfollikelanteils aus.¹¹⁶ Die Hyperkeratose, die durch die gesteigerte Keratinozytenproliferation zustande kommt, ist folglich der entscheidende Punkt, der zu einer Okklusion des Follikels führt und den weiteren Entzündungsprozess in Gang setzt. Neben den

Ergebnissen dieser Arbeit konnte auch in anderen Studien eine gesteigerte Proliferation in AI-Läsionen gezeigt werden.^{131,132} Die Autoren sprechen hier auch von einer autoimmunen Verhornungsstörung: Die zytokinvermittelte Aktivierung der Keratinozyten induziert eine gesteigerte Proliferation mit einer Hyperplasie des Follikelepithels sowie einer psoriasiformen Hyperplasie.¹¹² Neben einer Zunahme der Epidermisdicke in den histologischen AI-Präparaten konnte man auch eine gesteigerte Mitoserate anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 (Abb. 13.1g) und teilweise eine epidermale psoriasiforme Hyperplasie mit massiven subepidermalen entzündlichen Infiltraten erkennen (Abb. 13.2d).

Es existieren einige Arbeiten, die den Zusammenhang zwischen gesteigerter Proliferation und mTOR-Aktivität zeigen. In einer Studie wurden synoviale Fibroblasten von psoriatisch befallenen Gelenken und Keratinozyten nicht-läsionaler Psoriasishautproben mit mTOR-Inhibitoren Rapamycin und NVP-BEZ235 behandelt. Bei NVP-BEZ235 handelt es sich um einen Inhibitor, der sowohl PI3-K als auch die mTOR-Kinase hemmt. Die Behandlung mit den Inhibitoren konnte in beiden Zelltypen signifikant die Proliferation reduzieren.¹³³ Interessanterweise konnte bereits in periläsionaler AI-Haut eine starke mTOR-Aktivität beobachtet werden (Abb. 9.1), was darauf hindeutet, dass bereits eine subklinische Entzündung die mTOR-Hyperaktivierung triggern und zu epidermalen Veränderungen führen kann. Buerger *et al.* haben ausführlich die Bedeutung des mTOR-Signalwegs in der Psoriasis vulgaris untersucht und festgestellt, dass mTORC1 als ein zentraler Schalter zwischen der Keratinozytenproliferation und -differenzierung fungiert und seine Hyperaktivierung zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Differenzierung führt. Im Stratum basale gesunder Haut ist der mTORC1-Signalweg aktiv und steuert die Proliferation, während die Zelldifferenzierung gleichzeitig blockiert wird. In suprabasalen Epidermisschichten ist mTORC1 inaktiviert, was Keratinozytendifferenzierung ermöglicht. In entzündlichen Dermatosen wie in der Psoriasis vulgaris ist mTORC1 in der gesamten Epidermis aktiviert, was zu einer massiven Proliferation im Stratum basale und einer gestörten Keratinozytendifferenzierung in den suprabasalen Epidermisschichten führt,⁹¹ Gleiches wird in der AI vermutet. Dies konnten die hier gezeigten immunhistochemischen Färbungen mit Differenzierungsmarkern deutlich demonstrieren. Insbesondere war die Expression von K10 insgesamt im

Vergleich zur gesunden Haut schwächer (Abb. 12), während IVL eine abnorme Verteilung in tiefen Epidermisschichten aufwies und in der AI teilweise bereits im Stratum basale vorkam. FLG, ein Marker der späten Differenzierung, welcher sich in gesunder Haut vor allem im Stratum granulosum findet, wurde in der AI teilweise bereits im Stratum spinosum exprimiert. Kurokawa *et al.* untersuchten ebenfalls das Differenzierungsverhalten in der AI, sie analysierten immunhistochemisch das Epithel des drainierenden Sinustrakts von 14 AI-Patienten. Anhand von 6 Cytokeratin-Antikörpern konnten sie eine gestörte Differenzierung und Hyperproliferation feststellen.¹³⁴ Eine weitere Arbeit zeigte eine abweichende Cytokeratin- und Desmogleinexpression in AI-Läsionen im Vergleich zum normalen Epithel.^{132,135} Die Tatsache, dass mTOR und das nachgeschaltete ribosomale Protein S6 in den AI-Läsionen sowohl in basalen als auch in den suprabasalen Epidermisschichten hyperaktiviert sind, hängt womöglich mit dem pathologischen Einfluss zusammen, den sie in den einzelnen Schichten ausüben. Die erhöhte mTOR-Aktivität im Stratum basale könnte somit mit der gesteigerten Proliferationsrate assoziiert sein. Im Gegensatz dazu könnte die Hyperaktivierung in den suprabasalen Schichten, wo sich die Zellen normalerweise aus der Proliferation zurückgezogen haben, mit der gestörten Differenzierung im Zusammenhang stehen.

Eine Hyperaktivierung von mTORC1 trägt nicht nur zur Entstehung von entzündlichen Dermatosen wie Psoriasis vulgaris und Acne inversa bei, sondern spielt auch eine wichtige Schlüsselrolle bei der Pathogenese von Diabetes mellitus.¹³⁶ mTOR aktiviert die S6-Kinase, die wiederum die Phosphorylierung und den Abbau des Insulinrezeptorsubstrats 1/2 bewirkt. Diese Desensibilisierung des Insulinsignalwegs ist ein normaler physiologischer Mechanismus, der dazu führt, dass Signalleitung nach erfolgreicher Aktivierung wieder abgeschaltet wird, um einer dauerhaften unkontrollierten Insulinwirkung entgegenzuwirken. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie bei einer Hyperaktivierung des mTORC1-Signalwegs hingegen kann es durch die beeinträchtigte Insulinwirkung zu einer Insulinresistenz kommen.¹³⁷ Zusätzlich hat mTOR Einfluss auf die Insulinsignalübertragung über das Growth factor receptor-bound protein 10 (GRB10). mTORC1 phosphoryliert und stabilisiert GRB10, welches wiederum die Interaktion zwischen Insulinrezeptor und Insulinrezeptorsubstrat über die Phosphotyrosin-bindende Domäne blockiert,

was unter pathophysiologischen Bedingungen ebenfalls zur Entstehung der Insulinresistenz beiträgt.^{125,138} Um der Manifestation von Diabetes mellitus entgegenzuwirken, führt die mTOR-Aktivierung durch Glucose zunächst zu einer Hypertrophie der Beta-Zellen und einer erhöhten Insulinsekretion, dies verhindert eine Hyperglykämie und kompensiert anfänglich die Insulinresistenz. Mit der Zeit verursacht die chronische mTOR-Hyperaktivierung eine Resistenz der Beta-Zellen gegenüber Insulin-like growth factor 1 und Insulin, beide induzieren normalerweise eine Proliferation der Beta-Zellen.^{125,139,140} Dadurch wird der Zelltod begünstigt. Interessanterweise ist Hidradenitis suppurativa mit einer erhöhten Prävalenz von Insulinresistenz assoziiert.¹⁴¹ Gemäß einer Metaanalyse mit 104373 Patienten aus 7 Studien betrug die Prävalenz von Diabetes mellitus bei Patienten, welche an Acne inversa erkrankt waren, 10,6 %. Bei Patienten ohne AI waren es dagegen nur 3,8 %.¹⁴² Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mTOR bei den an AI erkrankten Patienten nicht nur in der Epidermis hyperaktiviert ist, sondern auch in anderen Zellarten wie in der Leber und im Muskelgewebe, welche für die Glukosehomöostase verantwortlich sind. Die mTOR-Aktivierung führt dort zur Entstehung einer Insulinresistenz. Bei der AI handelt es sich somit um eine Systemerkrankung, welche sich bei den Patienten neben den typischen Hautläsionen zusätzlich in Form von Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus manifestiert.¹⁴³

Außerdem reguliert und fördert mTOR die Differenzierung von TH17-Zellen. In verschiedenen Studien konnten in den AI-Proben erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, darunter auch IL-17A, welches von den TH17-Zellen sezerniert wird, nachgewiesen werden. In Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wurden ebenfalls erhöhte IL-17 Konzentrationen im Serum gemessen. Dumanovic *et al.* zeigten, dass ein rückläufiges Hämoglobin A1c (HbA1c) mit einer IL-17-Regredienz einherging. Ein IL-17-Mangel erhöhte außerdem die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität bei Mäusen.¹⁴⁴ In einer Studie mit 20 AI-Patienten im Hurley-Stadium II und III zeigte die Behandlung mit Secukinumab, einem Anti-IL-17A-Antikörper, vielversprechende Ergebnisse: Nach einer 24-wöchigen Secukinumab Behandlung konnte bei 75 % der Patienten eine Reduktion der Summe von Abszessen und entzündlichen Knoten um mindestens 50 % im Vergleich zum Ausgangswert erreicht werden.¹⁴⁵ Mehrere Studien zeigten neben IL-17A auch erhöhte Spiegel von TNF- α in Hautläsionen von AI

Patienten. Es ist bekannt, dass TNF- α zur Entstehung der Insulinresistenz beiträgt: TNF- α aktiviert die c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) und die IKK β , die beide IRS-1 inhibitorisch phosphorylieren und somit zur Aufhebung der Insulinwirkung führen.¹⁴⁶ Die aktivierte IKK β wiederum inaktiviert zusätzlich TSC1, welches mTORC1 negativ reguliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Daten dieser Arbeit wichtige Hinweise darauf geben, dass der mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Acne inversa einnimmt. Die durch proinflammatorische Zytokine induzierte Aktivierung des Signalwegs scheint eine abnorme Differenzierung zu induzieren und eine gesteigerte Keratinozytenproliferation zu triggern, die zu einer Okklusion des Haarfollikels mit anschließender Entzündung führt. Zusätzlich werden durch die Hyperaktivierung des Signalwegs die metabolischen Vorgänge beeinflusst. Daher könnte es erfolgsversprechend sein, die Proteine des Signalwegs als mögliche Therapietargets in Betracht zu ziehen und mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin und dessen Derivate zukünftig als eine mögliche Option in der AI-Behandlung zu untersuchen.

4.2 Interaktion zwischen mTOR-Signalweg und JAK/STAT3-Signalweg

Eine Deregulierung des JAK/STAT-Signalwegs spielt nicht nur eine Rolle in den hämatologisch malignen und neoplastischen Erkrankungen, sondern nimmt auch einen zentralen Stellenwert in entzündlichen Dermatosen, wie Psoriasis vulgaris und atopische Dermatitis, ein.¹⁴⁷ In dieser Arbeit konnten neben einer mTOR- und S6-Hyperaktivierung außerdem eine erhöhte STAT3-Aktivität in den AI-Läsionen nachgewiesen werden. Dabei zeigten die immunhistochemischen Färbungen eine Phosphorylierung sowohl am Y705- als auch am S727-Rest, wobei besonders auffällig war, dass die STAT3-Serin-Aktivität mit der von mTOR korrelierte und vor allem in den suprabasalen Epidermisschichten am stärksten war (Abb. 17). Die STAT3-Phosphorylierung erfolgt normalerweise zytokinvermittelt durch JAK1/2 oder TYK2, wobei diese STAT3 an Y705 phosphorylieren, was zu einer Dimerisierung führt.¹⁰¹ Es ist außerdem bekannt, dass der mTORC1-Komplex STAT3 an S727 in verschiedenen Zellmodellen phosphorylieren kann.^{107,108,148,149} In einer Studie wurden T-Zellen mit IL-12

stimuliert, ein Teil dieser Zellen wurde zusätzlich mit Rapamycin behandelt. Schließlich konnte im Western Blot gezeigt werden, wie eine IL-12-induzierte Serinphosphorylierung von STAT3 durch Rapamycin abgeschwächt wurde. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass STAT3 ein Substrat von mTOR ist.¹⁴⁹ In einer weiteren Arbeit zeigten Yokogami *et al.*, dass die durch den CNTF, ein Zytokin der IL-6 Familie, induzierte STAT3-Phosphorylierung an S727 durch Rapamycin, einem mTORC1 Inhibitor, blockiert werden kann.¹⁰⁸

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western Blots konnten die Ergebnisse aus den genannten Studien bestätigen. Die Stimulation der HaCaT-Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen, welche bekanntlich den mTORC1-Signalweg aktivieren, führte zu einer deutlichen Phosphorylierung von STAT3 am Serinrest (Abb. 15a, b). Der Einsatz von Rapamycin führte neben einer reduzierten Phosphorylierung von mTOR außerdem zu einer fehlenden Aktivierung von STAT3 am Serinrest (Abb. 16). Demzufolge liegt es nahe, dass STAT3 nicht nur durch die Januskinase, sondern auch durch die mTOR-Kinase phosphoryliert werden kann. Die Stimulation der HaCaT-Zellen mit dem Mix aus IL-1 β , TNF- α und IL-17A führte dagegen nicht zu einer STAT3-Aktivierung am Y705-Rest und auch Rapamycin hatte nach zuvor erfolgter Aktivierung der Zellen durch Stimulation mit IL-22 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung am Y705-Rest (Abb. 16). Die immunhistochemischen Färbungen zeigten ähnliche Ergebnisse: In den AI-Läsionen war eine deutlich erhöhte Aktivierung sowohl von STAT3-S727 als auch STAT3-Y705 zu erkennen. Jedoch konnte an dieser Stelle eine Tendenz beobachtet werden: Im Gegensatz zu STAT3-Y705 korrelierte die mTOR-Aktivität mit der STAT3-S727-Aktivität im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum. Somit wird mTORC1 als Kinase diskutiert, welche in der Acne inversa STAT3 an S727 phosphorylieren kann und damit zur Aktivierung beiträgt. Es ist bekannt, dass Serin/Threonin-Kinasen STAT3 im Zytoplasma oder im Zellkern an S727 phosphorylieren. Die Serinphosphorylierung kann die Transkriptionsaktivität von STAT3 durch die Rekrutierung von Transkriptions-Cofaktoren wie der Histon-Acetyltransferase p300/CBP verstärken.¹²³ Die P-STAT3-Y705 positiven Zellkerne fanden sich dagegen in der gesamten Epidermis, auch in Schichten geringer mTOR-Aktivität. An Y705 phosphorylierte STAT3-Moleküle bilden Dimere, die aus dem Zytoplasma in den Zellkern wandern, dort an die DNA binden und die Transkription regulieren.

Anhand dieser Ergebnisse und der Daten aus den hier genannten Studien stellt sich die Frage, ob nicht beide Signalwege, sowohl mTORC1- als auch JAK/STAT-Signalweg, an der AI-Entstehung beteiligt sind.

4.3 Bedeutung der Arbeit für das Verständnis der Pathogenese und die therapeutische Behandlung der Acne inversa

Für die Therapie der Acne inversa stehen unterschiedliche Behandlungsmethoden zur Verfügung, trotz diverser Therapieansätze ist die Behandlung oftmals schwierig und wirkt sich negativ auf die Lebensqualität der Patienten aus. Da die vorhandenen Therapieoptionen oft an ihre Grenzen stoßen, ist die komplette Exzision der erkrankten Hautareale aufgrund der mangelnden effektiven und kurativen Behandlungsmöglichkeiten häufig nicht zu vermeiden. Daher ist die Entwicklung neuer topischer oder systemischer Therapiemaßnahmen mit möglichst wenigen Nebenwirkungen und die Erforschung neuer Zielproteine, die als Therapietargets fungieren könnten, von großer Bedeutung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindrucksvoll die Relevanz des PI3-K/Akt/mTOR-Signalweges in der Acne inversa. Es konnte eine erhöhte Aktivität von mTOR in läsionaler und periläsionaler Haut von AI-Patienten sowie des nachgeschalteten ribosomalen Proteins S6 nachgewiesen werden. Der PI3-K/PKB/Akt/mTOR-Signalweg könnte somit potenziell einen therapeutischen Angriffspunkt in der Behandlung der Acne inversa darstellen. Sirolimus, auch Rapamycin genannt, ist ein bekannter mTOR-Inhibitor, welcher bereits seit langer Zeit zu den Standardpräparaten in der immunsuppressiven Therapie in der Transplantationsmedizin zählt.¹⁵⁰ Auch zum Einsatz in der Psoriasis vulgaris liegen erfolgsversprechende Daten vor. In einer Phase-II randomisiert kontrollierten Studie konnte ein erfolgreicher therapeutischer Effekt der oralen Kombinationstherapie aus Sirolimus und einer subtherapeutischen Dosis Cyclosporin im Vergleich zur Sirolimusmonotherapie gezeigt werden.^{151,152} Die Autoren Wei und Lai berichteten von einem nierentransplantierten Patienten unter Immunsuppression mit Tacrolimus, der nach der Transplantation trotz Tacrolimus eine Exazerbation der bereits vor mehreren Jahren diagnostizierten Psoriasis vulgaris entwickelte. Nach Hinzugabe von Everolimus, einem mTOR-Inhibitor, konnte eine Besserung des Hautbefundes erzielt werden. Der

Therapieerfolg in diesem Patientenfall deutet ähnlich wie bei der erfolgreichen Kombination von Sirolimus und Cyclosporin auf den synergistischen Effekt beider Medikamente hin, außerdem ermöglicht die Kombination zweier Präparate den Einsatz niedriger Dosierungen, was gleichzeitig mit weniger Nebenwirkungen verbunden ist.¹⁵³

Eine weitere Studie untersuchte die topische Applikation von Sirolimus, dabei konnten zwar keine Besserungen der Plaquedicke und des Erythems erzielt werden, jedoch zeigte sich eine signifikante Minderung des klinischen Scores. Außerdem konnte die Arbeit von Ormerod *et al.* eine Reduktion der CD4+- und Ki-67-Zellen in den Hautbiopsien nach topischer Sirolimusbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen, was die antiproliferative und anti-inflammatorische Wirkung von Rapamycin unterstreicht.^{152,154} Auch Buerger *et al.* demonstrierten anhand eines imiquimodinduzierten Psoriasis-Mausmodells erfolgreich die topische Wirkung von Rapamycin. Die Wirkung beruht darauf, dass Rapamycin an das zytoplasmatische Protein FKPB-12 bindet, welches mit mTORC1 interagiert und dadurch die mTOR-Zielproteine S6 und 4E-BP blockiert, die wiederum für die Proteinsynthese und damit für das Zellwachstum und die Proliferation von großer Bedeutung sind.¹⁵⁵ Neben der Besserung des makroskopischen Hautbefundes der Maus nach topischer Behandlung mit Rapamycin konnte außerdem immunhistochemisch eine fehlende bzw. verminderte Expression der phosphorylierten mTOR-Kinase und des ribosomalen Proteins S6 im Vergleich zu den mit Imiquimod behandelten Proben beobachtet werden. Weitere immunhistochemische Färbungen zeigten außerdem eine Reduktion des Proliferationsmarkers Ki-67 und Normalisierung der epidermalen Keratinozytendifferenzierung durch die Rapamycinbehandlung.¹⁵⁶ All diese Daten verdeutlichen den positiven Effekt von mTOR-Inhibitoren auf die gesteigerte Aktivität der mTOR-Kinase in der Psoriasis vulgaris. Gerade die topische Behandlung könnte erfolgsversprechend sein, da der lokale Effekt im Vordergrund steht und die systemischen Nebenwirkungen somit reduziert werden könnten.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen anhand der immunhistochemischen Färbungen eine erhöhte Aktivität des PI3-K/PKB/Akt/mTOR-Signalwegs in der Acne inversa, die mit einer gestörten epidermalen Differenzierung und einer gesteigerten Keratinozytenproliferationsrate assoziiert ist. Bisherige Studien

weisen ebenfalls darauf hin, dass mTORC1 nicht nur in der Psoriasis, sondern auch in der Acne inversa hochreguliert ist.^{124,125} Aus diesem Grund ist es denkbar, dass die Inhibitoren dieses Signalwegs auch in der Acne inversa von Nutzen sein könnten. Kürzlich untersuchte eine Studie den Einsatz von TNF- α -Inhibitoren in Kombination mit oraler Sirolimusgabe. In die Studie wurden neun Patienten mit einer therapierefraktären AI im Hurley-Stadium III eingeschlossen. Zu Beginn der Sirolimusgabe waren sieben Patienten unter Infliximab- und jeweils ein Patient unter Adalimumab- und Certolizumabtherapie. Jeweils zwei Patienten erhielten zusätzlich Glukokortikoide und Isotretinoin. Der Einsatz von Sirolimus führte bei sieben von neun Patienten zu einem sehr guten Ansprechen der Erkrankung auf die Therapie. Unerwünschte Nebenwirkungen unter Sirolimus wie Dyslipidämie, Hyperglykämie oder eine Zytopenie traten zwar nicht auf, jedoch kam es bei einem Patienten zu einer Erysipelbildung.¹⁵⁷ Diese kommt womöglich durch den Einsatz mehrerer Immunsuppressiva zustande. Eine weitere Arbeit zeigte ebenfalls die Wirksamkeit von Sirolimus in Kombination mit Adalimumab bei einem Patienten mit PASS-Syndrom (Pyoderma gangraenosum, Acne, Hidradenitis suppurativa, Spondylitis ankylosans).¹⁵⁸ Beide Arbeitsgruppen lieferten erfolgsversprechende Ergebnisse über die Wirksamkeiten von Sirolimus in Kombination mit TNF- α -Inhibitoren in der Behandlung der AI. Um das Risiko möglicher unerwünschter Nebenwirkungen zu minimieren, wäre eine topische Applikation der systemischen Therapie überlegen. Demnach ist die Durchführung weiterer Studien erforderlich, um die Wirksamkeit und Sicherheit systemischer und topischer Therapie mit mTOR-Inhibitoren in der AI zu beurteilen.

Neben einer mTOR-Hyperaktivierung zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine erhöhte STAT3-Aktivität in den AI-Läsionen, was auf die Beteiligung dieses Signalwegs an der Pathogenese der Acne inversa hindeutet. Eine weitere Arbeit deutet ebenfalls auf die Beteiligung des JAK/STAT-Signalwegs in der Entstehung der AI hin, dabei wurden gesunde Hautproben und Proben aus Läsionen von 34 AI-Patienten untersucht. Mittels Genexpressionsanalyse konnte in den AI-Läsionen eine erhöhte Expression von JAK1, JAK3 und TYK2 festgestellt werden. Die nachgeschalteten Moleküle wie STAT1, STAT2, STAT3, STAT5A, STAT5B und STAT6 waren ebenfalls überexprimiert.¹⁵⁹ Demzufolge könnte der JAK/STAT-Signalweg zukünftig ebenfalls ein potentiell therapeutisches Target

in der Behandlung der AI darstellen. Nakajima *et al.* beobachteten in einem Mausmodell mit einer kontinuierlichen STAT3-Aktivierung in den Keratinozyten die Entwicklung von psoriasis-ähnlichen Hautläsionen. In psoriatischer Haut wurde verstärkte Phosphorylierung von STAT3 an Y705 gemessen¹⁶⁰. *In vitro* konnten an einem mit IL-22 stimulierten Epidermis-Modell psoriasis-ähnliche Hautveränderungen, eine STAT3-Hyperaktivierung und eine Hemmung der terminalen Keratinozytendifferenzierung beobachtet werden.¹⁶¹ Außerdem zeigten STAT3-knock-in-Mäuse eine epidermale Hyperplasie mit einer aberranten Keratinozytendifferenzierung.¹⁶²

Zusätzlich konnte in Hautläsionen von Psoriasispatienten eine starke Aktivierung von Langerhans-Zellen gezeigt werden, bei inaktiviertem STAT3 war die Anzahl der Langerhans-Zellen wesentlich geringer. Außerdem zeigte sich in STAT3-Mäusen in Abwesenheit von Langerhans-Zellen ein deutlich weniger ausgeprägter Hautbefund, was darauf hindeutet, dass die STAT3-Aktivierung und die damit verbundene Aktivierung der Langerhans-Zellen zur Entwicklung der Psoriasis-Läsionen beiträgt.¹⁶³ Die aktivierten Langerhans-Zellen produzieren Zytokine wie IL-15 und IL-23 und verschiedene Chemokine (CXCL9, CXCL10 und CCL20). IL-15 und IL-23 induzieren die T-Zell-Aktivierung und Bildung von IL-22 und IL-17, die Chemokine sind für die weitere Rekrutierung von Lymphozyten verantwortlich. Beides führt zu einer gesteigerten Immunantwort und zur Ausbildung eines chronischen Entzündungsprozesses. Durch das Targeting des JAK/STAT-Signalwegs wäre somit in Bezug auf die gesteigerte Immunantwort eine therapeutische Wirkung zu erwarten.¹⁶⁴

Eine Phase-II-Studie gab Hinweise darauf, dass der JAK/STAT3-Signalweg ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Krankheitsentstehung der AI und der Aufrechterhaltung der Entzündung spielt.¹⁶⁵ Dabei wurde 10 AI-Patienten ein oraler JAK1 Inhibitor verabreicht. Über 50 % der Patienten sprachen positiv auf die Behandlung an und konnten den sogenannten „Hidradenitis Suppurativa Clinical Response“ erreichen. Dieser ist definiert durch eine mindestens 50 %ige Reduktion der Anzahl von Abszessen und entzündlichen Knoten ohne Zunahme neuer Abszesse und Fisteln im Vergleich zur Ausgangssituation. Zu Beginn der Studie befanden sich 3 von 10 Patienten im Hurley-Stadium III, der Rest wurde dem Hurley-Stadium II zugeordnet. Obwohl 3 Patienten die Behandlung nicht abgeschlossen haben, befand sich nach Abschluss der Therapie lediglich ein

Patient im Hurley-Stadium III. Ein Patient war am Ende der Behandlung sogar komplett läsionsfrei. Zwei Fallberichte demonstrieren eindrucksvoll den Erfolg von Tofacitinib, einem JAK1- und JAK3-Inhibitor, in Kombination mit anderen Präparaten. Bei einem der Patienten wurde Tofacitinib in Kombination mit Amoxicillin und Cyclosporin eingesetzt, im zweiten Fall kam es neben Tofacitinib zusätzlich zum Einsatz von Amoxicillin und Amoxicillin/Clavulansäure, Mycophenolat-Mofetil und topischen Steroiden. In beiden Fällen wurde Tofacitinib per os anstelle von diversen Biologika, die zuvor zu keinem Ansprechen geführt haben, verabreicht. Die therapeutischen Kombinationen führten bei beiden Patienten, welche sich zu Beginn der Behandlung im Hurley-Stadium III befanden, zu einer kompletten Wundheilung ohne Auftreten neuer Läsionen.¹⁶⁶ Diese Beispiele lassen vermuten, dass Tofacitinib durch die Hemmung von STAT3 die Immunantwort in der Acne inversa dämpft. Ein topischer Einsatz wäre ebenfalls denkbar, um die systemischen Nebenwirkungen zu minimieren. Eine Studie zur Untersuchung von 1,5 %igem Ruxolitinib, einem JAK 1 und 2 Inhibitor,¹⁶⁷ wird dies ab April 2022 testen.¹⁶⁸

Aufgrund der begrenzten Therapiemöglichkeiten in der Behandlung der AI könnten in Zusammenschau der vorliegenden Daten weitere Untersuchungen zu JAK-Inhibitoren neue therapeutische Wege öffnen. Im Hinblick auf eine mögliche Interaktion des JAK/STAT- und mTOR-Signalwegs an der Stelle der STAT3-Phosphorylierung (Abb. 19) wäre ein kombinierter Einsatz beider Inhibitoren, Rapamycin und Tofacitinib denkbar, um einen synergistischen Effekt zu erzielen. Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation eine Hyperaktivierung des PI3-K/Akt/PKB/mTOR-Signalweges in den AI-Läsionen dargestellt werden. Es wurde eine deutlich gesteigerte Aktivität der mTOR-Kinase und des nachgeschalteten ribosomalen Proteins S6 gezeigt, die sowohl in Versuchen dieser Arbeit als auch in anderen Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit einer aberranten Differenzierung und einer gesteigerten Keratinozytenproliferation steht. Zusätzlich konnte eine erhöhte Aktivität von STAT3 nachgewiesen werden, die einerseits hinweisend auf die Beteiligung des JAK/STAT-Signalwegs in der Pathogenese ist, andererseits aber auch eine Interaktion beider Signalwege aufzeigt. Aus diesen Daten ergeben sich neue, vielversprechende Therapieansätze für die Behandlung der Acne inversa, die zukünftig näher untersucht werden müssen.

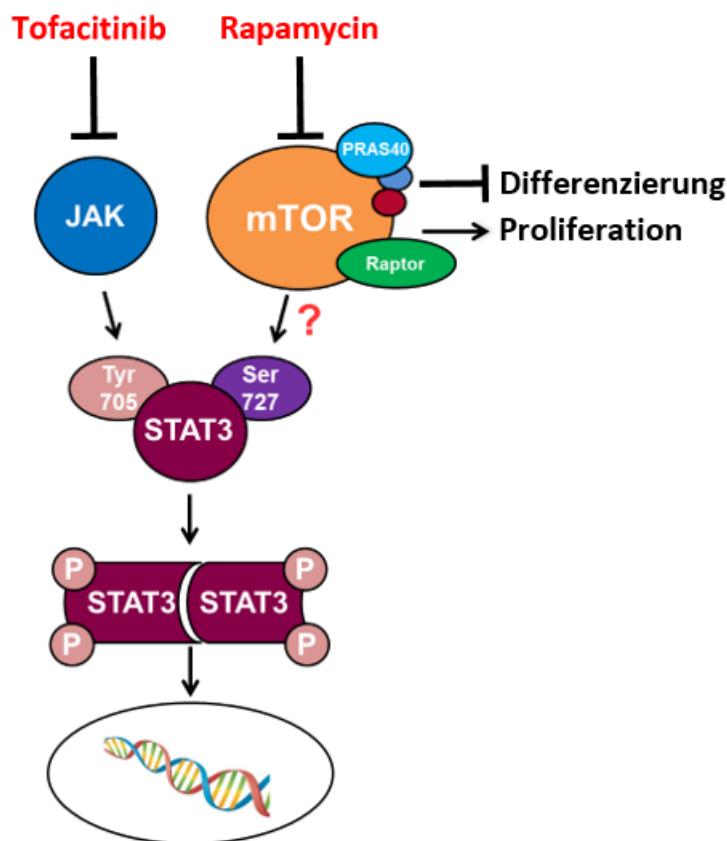


Abbildung 19: Schema einer möglichen Deregulierung des mTOR/STAT3-Signalwegs in der AI

Eine zytokingetriggerte JAK1/2-Aktivierung führt zu einer STAT3-Phosphorylierung, hauptsächlich am Y705-Rest, was zu einer STAT3-Dimerisierung und Translokation in den Zellkern führt, wo STAT3 in der Lage ist, Genexpression und diverse zelluläre Prozesse wie Entzündung und Zellproliferation zu regulieren. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass mTORC1 STAT3 ebenfalls am S727-Rest phosphoryliert.¹⁰⁷ In den immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit korrelierte die mTOR-Aktivität mit der STAT3-S727-Aktivität, was darauf hindeutet, dass mTOR STAT3 in der AI an S727 phosphoryliert. Im Hinblick auf eine Interaktion beider Signalwege könnte zukünftig ein kombinierter Einsatz beider Inhibitoren, Rapamycin und Tofacitinib, nützlich sein, um einen synergistischen Effekt zu erzielen.

5 Zusammenfassung

Acne inversa ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung der Terminalhaarfollikel und Talgdrüsen, die sich zu schmerzhaften tiefsitzenden Knoten entwickelt, welche in Abszessen und Fistelgängen resultieren können und mit starken Schmerzen und psychischen Belastungen für die Patienten einhergehen. Die Pathophysiologie der AI ist bisher nur unzureichend verstanden. Es wird angenommen, dass die IL-23-TH17-IL-17-Achse eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AI spielt. Neben der Hyperkeratose im Bereich des Terminalhaarfollikels scheinen die entzündlichen Infiltrate im Bereich

der Epidermis eine psoriasiforme Hyperplasie zu induzieren. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der mTORC1-Signalweg (mammalian target of rapamycin complex 1), welcher durch Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-17A aktiviert wird, in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris von großer Bedeutung ist. Aufgrund immunologischer und histologischer Gemeinsamkeiten beider Erkrankungen ist es denkbar, dass der mTORC1-Signalweg ebenfalls bei der Pathogenese und Progression der AI eine Rolle spielt, was im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte. Immunhistochemische Färbungen für phosphorylierte Komponenten des Signalwegs zeigten eine stark erhöhte mTORC1-Aktivität in den AI-Läsionen. Diese war abhängig vom Schweregrad der AI-Läsion sogar teilweise höher als in der Psoriasis vulgaris. Die starke Aktivierung der mTORC1-Kaskade korrelierte mit Stellen, die eine aberrante Expression von Differenzierungs-, Proliferations- und Entzündungsmarkern aufwiesen. Auffällig war ebenfalls die starke STAT3-Aktivierung, welche durch erhöhte Phosphorylierung an Y705 und S727 gemessen werden konnte und auch auf eine Beteiligung dieses Signalwegs an der Pathogenese hindeutet. Da es Hinweise auf Überschneidungen zwischen dem mTORC1-Signalweg und der ebenfalls in der Psoriasispathogenese involvierten STAT3-Kaskade gibt, wurde dieser Zusammenhang untersucht. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass psoriasis-typische Zytokine eine Phosphorylierung von STAT3 an S727 induzieren, was durch die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin gehemmt werden konnte.

Zusammenfassend deuten die hier gewonnenen Daten darauf hin, dass der PI3-K/Akt/mTOR-Signalweg, aber auch die JAK/STAT3-Kaskade eine entscheidende Rolle in der Acne inversa-Pathogenese spielen und damit potenziell neue Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Therapien darstellen können. Damit geben die gezeigten Ergebnisse vielversprechende Ansatzpunkte um pharmakologisch gut etablierte Medikamente wie z.B. Sirolimus oder Tofacitinib als neue Ansätze für die AI-Therapie weiter zu untersuchen.

6 Abstract

Hidradenitis suppurativa is a chronic inflammatory skin disease of the terminal hair follicles and sebaceous glands. HS is initially characterized by the presence

of subcutaneous painful nodules, that can lead to abscesses and chronic draining fistulas, which are associated with severe pain and psychological stress for the patients. So far, the pathophysiology of HS is only insufficiently understood. The IL-23/TH17 immune axis seems to play an important role in the pathogenesis of the skin disease. In addition to hyperkeratosis in the area of the terminal hair follicle, an inflammatory cell infiltration in the epidermis as well psoriasiform hyperplasia, point towards an overlap with the pathogenesis of psoriasis. It could be previously shown that the mTORC1 signaling pathway (mammalian target of rapamycin complex 1), which is activated by cytokines such as IL-1 β , TNF- α and IL-17A, plays a key role in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. Due to the immunological and histological similarities of both diseases, it was conceivable that the mTORC1 signaling pathway also plays a role in the pathogenesis and progression of the disease. Thus, the aim of this study was to investigate the role of mTORC1 signaling. Immunohistochemical staining for phosphorylated components of the pathway showed increased mTORC1 activity in the HS lesions. This was even higher than in psoriasis vulgaris and correlated with the severity degree of the HS lesions. The strong activation of the mTORC1 cascade correlated with sites of aberrant expression of differentiation, proliferation and inflammatory markers. In addition, strong STAT3 activation, measured by increased phosphorylation at Y705 and S727, suggests an involvement of the JAK/STAT cascade not only in psoriasis but also in HS. Since there are indications of an interaction between the mTORC1 and the STAT3 cascade this relationship was investigated *in vitro*. It could be shown that psoriasis cytokines induced phosphorylation of STAT3 at S727, which could be inhibited by treatment with the mTOR inhibitor rapamycin.

In summary, the results indicate, that the PI3-K/Akt/mTOR pathway, but also the JAK/STAT3 cascade, may play a crucial role in hidradenitis suppurativa pathogenesis and may represent potential new therapeutic targets. Thus, the data provide promising starting points to further investigate pharmacologically well-established drugs such as sirolimus or tofacitinib as novel approaches for HS therapy.

7 Literaturverzeichnis

1. Aumüller G, Wurzinger LJ. *Anatomie: 208 Tabellen*. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010. Duale Reihe. <http://ebooks.thieme.de/9783131360427>.
2. Moll I, ed. *Dermatologie*. 8. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016. Duale Reihe.
3. Fritsch P, Schwarz T. *Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas*. 3. vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
4. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K, eds. *Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Sechste, neu verfaßte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer; 1995. Springer-Lehrbuch.
5. Hachem JP. The two compartment model of the stratum corneum: biochemical aspects and pathophysiological implications. *Verh K Acad Geneeskd Belg*. 2006;68(5-6):287-317.
6. Watt FM. Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol*. 1983;81(1 Suppl):100s-3s. doi:10.1111/1523-1747.ep12540786.
7. McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):280-291. doi:10.1016/j.jaci.2012.12.668.
8. Drozdoff V, Pledger WJ. Commitment to differentiation and expression of early differentiation markers in murine keratinocytes in vitro are regulated independently of extracellular calcium concentrations. *J Cell Biol*. 1993;123(4):909-919. doi:10.1083/jcb.123.4.909.
9. Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008;17(12):1063-1072. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
10. Gulliver W, Zouboulis CC, Prens E, Jemec GBE, Tzellos T. Evidence-based approach to the treatment of hidradenitis suppurativa/acne inversa, based on the European guidelines for hidradenitis suppurativa. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(3):343-351. doi:10.1007/s11154-016-9328-5.

11. Ather S, Chan DSY, Leaper DJ, Harding KG. Surgical treatment of hidradenitis suppurativa: case series and review of the literature. *Int Wound J*. 2006;3(3):159-169. doi:10.1111/j.1742-481X.2006.00235.x.
12. Revuz J. Hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23(9):985-998. doi:10.1111/j.1468-3083.2009.03356.x.
13. Napolitano M, Megna M, Timoshchuk EA, et al. Hidradenitis suppurativa: from pathogenesis to diagnosis and treatment. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017;10:105-115. doi:10.2147/CCID.S111019.
14. Vinkel C, Thomsen SF. Hidradenitis Suppurativa: Causes, Features, and Current Treatments. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2018;11(10):17-23.
15. Vazquez BG, Alikhan A, Weaver AL, Wetter DA, Davis MD. Incidence of hidradenitis suppurativa and associated factors: a population-based study of Olmsted County, Minnesota. *J Invest Dermatol*. 2013;133(1):97-103. doi:10.1038/jid.2012.255.
16. Wollina U, Koch A, Heinig B, Kittner T, Nowak A. Acne inversa (Hidradenitis suppurativa): A review with a focus on pathogenesis and treatment. *Indian Dermatol Online J*. 2013;4(1):2-11. doi:10.4103/2229-5178.105454.
17. Rompel R, Petres J. Long-Term Results of Wide Surgical Excision in 106 Patients with Hidradenitis Suppurativa. *Dermatologic Surgery*. 2000;26(7):638-643. doi:10.1046/j.1524-4725.2000.00043.x.
18. Zouboulis CC, Bechara FG, Fritz K, et al. S1-Leitlinie zur Therapie der Hidradenitis suppurativa/Acne inversa* (ICD-10 Ziffer: L73.2). *J Dtsch Dermatol Ges*. 2012;10 Suppl 5:S1-31. doi:10.1111/j.1610-0387.2012.08006.x.
19. Magalhães RF, Rivitti-Machado MC, Duarte GV, et al. Consensus on the treatment of hidradenitis suppurativa - Brazilian Society of Dermatology. *An Bras Dermatol*. 2019;94(2 Suppl 1):7-19. doi:10.1590/abd1806-4841.20198607.
20. Monfrecola G, Megna M. Classification and severity scales. In: Micali G, ed. *Hidradenitis Suppurativa*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017:39-45.
21. Zouboulis CC, Tzellos T, Kyrgidis A, et al. Development and validation of the International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System (IHS4), a novel dynamic scoring system to assess HS severity. *British Journal of Dermatology*. 2017;177(5):1401-1409. doi:10.1111/bjd.15748.

22. Hessam S, Scholl L, Sand M, Schmitz L, Reitenbach S, Bechara FG. A Novel Severity Assessment Scoring System for Hidradenitis Suppurativa. *JAMA Dermatol.* 2018;154(3):330-335. doi:10.1001/jamadermatol.2017.5890.
23. Patel ZS, Hoffman LK, Buse DC, et al. Pain, Psychological Comorbidities, Disability, and Impaired Quality of Life in Hidradenitis Suppurativa corrected. *Curr Pain Headache Rep.* 2017;21(12):49. doi:10.1007/s11916-017-0647-3.
24. Tzellos T, Zouboulis CC. Review of Comorbidities of Hidradenitis Suppurativa: Implications for Daily Clinical Practice. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2020;10(1):63-71. doi:10.1007/s13555-020-00354-2.
25. Vekic DA, Frew J, Cains GD. Hidradenitis suppurativa, a review of pathogenesis, associations and management. Part 1. *Australas J Dermatol.* 2018;59(4):267-277. doi:10.1111/ajd.12770.
26. Smith MK, Nicholson CL, Parks-Miller A, Hamzavi IH. Hidradenitis suppurativa: an update on connecting the tracts. *F1000Res.* 2017;6:1272. doi:10.12688/f1000research.11337.1.
27. Kurzen H, Kurokawa I, Jemec GBE, et al. What causes hidradenitis suppurativa? *Exp Dermatol.* 2008;17(5):455-6; discussion 457-72. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00712_1.x.
28. Kamp S, Fiehn AM, Stenderup K, et al. Hidradenitis suppurativa: a disease of the absent sebaceous gland? Sebaceous gland number and volume are significantly reduced in uninvolved hair follicles from patients with hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.* 2011;164(5):1017-1022. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10224.x.
29. Yazdanyar S, Jemec GBE. Hidradenitis suppurativa: a review of cause and treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24(2):118-123. doi:10.1097/QCO.0b013e3283428d07.
30. Vossen ARJV, van der Zee HH, Prens EP. Hidradenitis Suppurativa: A Systematic Review Integrating Inflammatory Pathways Into a Cohesive Pathogenic Model. *Front Immunol.* 2018;9:2965. doi:10.3389/fimmu.2018.02965.
31. Goldberg SR, Strober BE, Payette MJ. Hidradenitis suppurativa: Epidemiology, clinical presentation, and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol.* 2020;82(5):1045-1058. doi:10.1016/j.jaad.2019.08.090.

32. Sabat R, Jemec GBE, Matusiak Ł, Kimball AB, Prens E, Wolk K. Hidradenitis suppurativa. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):18. doi:10.1038/s41572-020-0149-1.
33. Wolk K, Wenzel J, Tsaousi A, et al. Lipocalin-2 is expressed by activated granulocytes and keratinocytes in affected skin and reflects disease activity in acne inversa/hidradenitis suppurativa. *British Journal of Dermatology*. 2017;177(5):1385-1393. doi:10.1111/bjd.15424.
34. Sabat R, Tsaousi A, Rossebacher J, et al. Acne inversa/Hidradenitis suppurativa: Ein Update. *Hautarzt*. 2017;68(12):999-1006. doi:10.1007/s00105-017-4082-5.
35. Hotz C, Boniotto M, Guguin A, et al. Intrinsic Defect in Keratinocyte Function Leads to Inflammation in Hidradenitis Suppurativa. *J Invest Dermatol*. 2016;136(9):1768-1780. doi:10.1016/j.jid.2016.04.036.
36. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-189. doi:10.1189/jlb.0603252.
37. Kao C-Y, Chen Y, Thai P, et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol*. 2004;173(5):3482-3491. doi:10.4049/jimmunol.173.5.3482.
38. Sabat R, Wolk K, Loyal L, Döcke W-D, Ghoreschi K. T cell pathology in skin inflammation. *Semin Immunopathol*. 2019;41(3):359-377. doi:10.1007/s00281-019-00742-7.
39. Wolk K, Warszawska K, Hoeflich C, et al. Deficiency of IL-22 contributes to a chronic inflammatory disease: pathogenetic mechanisms in acne inversa. *J Immunol*. 2011;186(2):1228-1239. doi:10.4049/jimmunol.0903907.
40. Chiricozzi A, Raimondo A, Lembo S, et al. Crosstalk between skin inflammation and adipose tissue-derived products: pathogenic evidence linking psoriasis to increased adiposity. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016;12(12):1299-1308. doi:10.1080/1744666X.2016.1201423.
41. Wolk K, Witte E, Warszawska K, et al. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol*. 2009;39(12):3570-3581. doi:10.1002/eji.200939687.

42. Gimblet C, Loesche MA, Carvalho L, et al. IL-22 Protects against Tissue Damage during Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0134698. doi:10.1371/journal.pone.0134698.
43. Sabat R, Wolk K. Deciphering the role of interleukin-22 in metabolic alterations. *Cell Biosci*. 2015;5:68. doi:10.1186/s13578-015-0060-8.
44. Melnik BC, Plewig G. Impaired Notch-MKP-1 signalling in hidradenitis suppurativa: an approach to pathogenesis by evidence from translational biology. *Exp Dermatol*. 2013;22(3):172-177. doi:10.1111/exd.12098.
45. Schlapbach C, Hänni T, Yawalkar N, Hunger RE. Expression of the IL-23/Th17 pathway in lesions of hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(4):790-798. doi:10.1016/j.jaad.2010.07.010.
46. Moran B, Sweeney CM, Hughes R, et al. Hidradenitis Suppurativa Is Characterized by Dysregulation of the Th17:Treg Cell Axis, Which Is Corrected by Anti-TNF Therapy. *J Invest Dermatol*. 2017;137(11):2389-2395. doi:10.1016/j.jid.2017.05.033.
47. Seyed Jafari SM, Hunger RE, Schlapbach C. Hidradenitis Suppurativa: Current Understanding of Pathogenic Mechanisms and Suggestion for Treatment Algorithm. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:68. doi:10.3389/fmed.2020.00068.
48. Hana A, Booken D, Henrich C, et al. Functional significance of non-neuronal acetylcholine in skin epithelia. *Life Sci*. 2007;80(24-25):2214-2220. doi:10.1016/j.lfs.2007.02.007.
49. Nyunoya T, Mebratu Y, Contreras A, Delgado M, Chand HS, Tesfaigzi Y. Molecular processes that drive cigarette smoke-induced epithelial cell fate of the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(3):471-482. doi:10.1165/rcmb.2013-0348TR.
50. Kelly G, Prens EP. Inflammatory Mechanisms in Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Clin*. 2016;34(1):51-58. doi:10.1016/j.det.2015.08.004.
51. Sabat R, Chanwangpong A, Schneider-Burrus S, et al. Increased Prevalence of Metabolic Syndrome in Patients with Acne Inversa. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31810. doi:10.1371/journal.pone.0031810.
52. Gold DA, Reeder VJ, Mahan MG, Hamzavi IH. The prevalence of metabolic syndrome in patients with hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(4):699-703. doi:10.1016/j.jaad.2013.11.014.

- 53.Lim ZV, Oon HH. Management of Hidradenitis Suppurativa in Patients with Metabolic Comorbidities. *Ann Dermatol.* 2016;28(2):147. doi:10.5021/ad.2016.28.2.147.
- 54.Lee EY, Alhusayen R, Lansang P, Shear N, Yeung J. What is hidradenitis suppurativa? *Can Fam Physician.* 2017;63(2):114-120.
- 55.Pink AE, Simpson MA, Desai N, Trembath RC, Barker JNW. γ -Secretase mutations in hidradenitis suppurativa: new insights into disease pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):601-607. doi:10.1038/jid.2012.372.
- 56.van Straalen KR, Prens EP, Willemsen G, Boomsma DI, van der Zee HH. Contribution of Genetics to the Susceptibility to Hidradenitis Suppurativa in a Large, Cross-sectional Dutch Twin Cohort. *JAMA Dermatol.* 2020;156(12):1359-1362. doi:10.1001/jamadermatol.2020.3630.
- 57.Guet-Revillet H, Jais J-P, Ungeheuer M-N, et al. The Microbiological Landscape of Anaerobic Infections in Hidradenitis Suppurativa: A Prospective Metagenomic Study. *Clin Infect Dis.* 2017;65(2):282-291. doi:10.1093/cid/cix285.
- 58.Hunger RE, Surovy AM, Hassan AS, Braathen LR, Yawalkar N. Toll-like receptor 2 is highly expressed in lesions of acne inversa and colocalizes with C-type lectin receptor. *Br J Dermatol.* 2008;158(4):691-697. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08425.x.
- 59.Sellheyer K, Krahl D. What causes acne inversa (or hidradenitis suppurativa)?--the debate continues. *J Cutan Pathol.* 2008;35(7):701-703. doi:10.1111/j.1600-0560.2008.01073.x.
- 60.Shanmugam VK, Jones D, McNish S, Bendall ML, Crandall KA. Transcriptome patterns in hidradenitis suppurativa: support for the role of antimicrobial peptides and interferon pathways in disease pathogenesis. *Clin Exp Dermatol.* 2019;44(8):882-892. doi:10.1111/ced.13959.
- 61.Hunger RE, Laffitte E, Läuchli S, et al. Swiss Practice Recommendations for the Management of Hidradenitis Suppurativa/Acne Inversa. *Dermatology (Basel).* 2017;233(2-3):113-119. doi:10.1159/000477459.
- 62.Nesbitt E, Clements S, Driscoll M. A concise clinician's guide to therapy for hidradenitis suppurativa. *Int J Womens Dermatol.* 2020;6(2):80-84. doi:10.1016/j.ijwd.2019.11.004.

- 63.Vekic DA, Cains GD. Hidradenitis suppurativa - Management, comorbidities and monitoring. *Aust Fam Physician*. 2017;46(8):584-588.
- 64.Riis PT, Boer J, Prens EP, et al. Intralesional triamcinolone for flares of hidradenitis suppurativa (HS): A case series. *J Am Acad Dermatol*. 2016;75(6):1151-1155. doi:10.1016/j.jaad.2016.06.049.
- 65.Clemmensen OJ. Topical treatment of hidradenitis suppurativa with clindamycin. *Int J Dermatol*. 1983;22(5):325-328. doi:10.1111/j.1365-4362.1983.tb02150.x.
- 66.Zouboulis CC, Bechara FG, Dickinson-Blok JL, et al. Hidradenitis suppurativa/acne inversa: a practical framework for treatment optimization - systematic review and recommendations from the HS ALLIANCE working group. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(1):19-31. doi:10.1111/jdv.15233.
- 67.Jemec GB, Wendelboe P. Topical clindamycin versus systemic tetracycline in the treatment of hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol*. 1998;39(6):971-974. doi:10.1016/s0190-9622(98)70272-5.
- 68.Ochi H, Tan LC, Oon HH. The effect of oral clindamycin and rifampicin combination therapy in patients with hidradenitis suppurativa in Singapore. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2018;11:37-39. doi:10.2147/CCID.S136730.
- 69.Mendonça CO, Griffiths CEM. Clindamycin and rifampicin combination therapy for hidradenitis suppurativa. *British Journal of Dermatology*. 2006;154(5):977-978. doi:10.1111/j.1365-2133.2006.07155.x.
- 70.Gener G, Canoui-Poitaine F, Revuz JE, et al. Combination therapy with clindamycin and rifampicin for hidradenitis suppurativa: a series of 116 consecutive patients. *Dermatology (Basel)*. 2009;219(2):148-154. doi:10.1159/000228334.
- 71.Yazdanyar S, Boer J, Ingvarsson G, Szepietowski JC, Jemec GBE. Dapsone therapy for hidradenitis suppurativa: a series of 24 patients. *Dermatology (Basel)*. 2011;222(4):342-346. doi:10.1159/000329023.
- 72.Frew JW, Hawkes JE, Krueger JG. Topical, systemic and biologic therapies in hidradenitis suppurativa: pathogenic insights by examining therapeutic mechanisms. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019;10:2040622319830646. doi:10.1177/2040622319830646.

73. Matusiak Ł, Bieniek A, Szepietowski JC. Bacteriology of hidradenitis suppurativa - which antibiotics are the treatment of choice? *Acta Derm Venereol.* 2014;94(6):699-702. doi:10.2340/00015555-1841.
74. Pradhan S, Madke B, Kabra P, Singh AL. Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of Antibiotics and Their Use in Dermatology. *Indian J Dermatol.* 2016;61(5):469-481. doi:10.4103/0019-5154.190105.
75. Fujioka S, Niu J, Schmidt C, et al. NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol.* 2004;24(17):7806-7819. doi:10.1128/MCB.24.17.7806-7819.2004.
76. Kimball AB, Okun MM, Williams DA, et al. Two Phase 3 Trials of Adalimumab for Hidradenitis Suppurativa. *N Engl J Med.* 2016;375(5):422-434. doi:10.1056/NEJMoa1504370.
77. Grant A, Gonzalez T, Montgomery MO, Cardenas V, Kerdel FA. Infliximab therapy for patients with moderate to severe hidradenitis suppurativa: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *J Am Acad Dermatol.* 2010;62(2):205-217. doi:10.1016/j.jaad.2009.06.050.
78. Fardet L, Dupuy A, Kerob D, et al. Infliximab for severe hidradenitis suppurativa: transient clinical efficacy in 7 consecutive patients. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56(4):624-628. doi:10.1016/j.jaad.2006.07.027.
79. Mekkes JR, Bos JD. Long-term efficacy of a single course of infliximab in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol.* 2008;158(2):370-374. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.08332.x.
80. Hendricks AJ, Hsiao JL, Lowes MA, Shi VY. A Comparison of International Management Guidelines for Hidradenitis Suppurativa. *Dermatology (Basel).* 2019;1-16. doi:10.1159/000503605.
81. Vossen ARJV, Ardon CB, van der Zee HH, Lubberts E, Prens EP. The anti-inflammatory potency of biologics targeting tumour necrosis factor- α , interleukin (IL)-17A, IL-12/23 and CD20 in hidradenitis suppurativa: an ex vivo study. *Br J Dermatol.* 2019;181(2):314-323. doi:10.1111/bjd.17641.
82. Marasca C, Megna M, Balato A, Balato N, Napolitano M, Fabbrocini G. Secukinumab and hidradenitis suppurativa: Friends or foes? *JAAD Case Rep.* 2019;5(2):184-187. doi:10.1016/j.jdcr.2018.12.002.
83. Tierney E, Mahmoud BH, Hexsel C, Ozog D, Hamzavi I. Randomized control trial for the treatment of hidradenitis suppurativa with a neodymium-doped

- yttrium aluminium garnet laser. *Dermatol Surg.* 2009;35(8):1188-1198. doi:10.1111/j.1524-4725.2009.01214.x.
- 84.Kamiya K, Kishimoto M, Sugai J, Komine M, Ohtsuki M. Risk Factors for the Development of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18). doi:10.3390/ijms20184347.
- 85.Pinter A, Kokolakis G, Rech J, et al. Hidradenitis Suppurativa and Concurrent Psoriasis: Comparison of Epidemiology, Comorbidity Profiles, and Risk Factors. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2020;10(4):721-734. doi:10.1007/s13555-020-00401-y.
- 86.Elsner P, Norgauer J, eds. *Psoriasis*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
- 87.Giuseppe P, Nicola P, Valentina C, et al. A Case of Moderate Hidradenitis Suppurativa and Psoriasis Treated with Secukinumab. *Ann Dermatol.* 2018;30(4):462-464. doi:10.5021/ad.2018.30.4.462.
- 88.Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.
- 89.Hassan B, Akcakanat A, Holder AM, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway. *Surg Oncol Clin N Am.* 2013;22(4):641-664. doi:10.1016/j.soc.2013.06.008.
- 90.LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat.* 2008;11(1-2):32-50. doi:10.1016/j.drup.2007.11.003.
- 91.Buerger C. Epidermal mTORC1 Signaling Contributes to the Pathogenesis of Psoriasis and Could Serve as a Therapeutic Target. *Front Immunol.* 2018;9:2786. doi:10.3389/fimmu.2018.02786.
- 92.Lee JY, Chiu Y-H, Asara J, Cantley LC. Inhibition of PI3K binding to activators by serine phosphorylation of PI3K regulatory subunit p85alpha Src homology-2 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(34):14157-14162. doi:10.1073/pnas.1107747108.
- 93.Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017;169(3):381-405. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001.
- 94.Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017;168(6):960-976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
- 95.Salido-Vallejo R, Garnacho-Saucedo G, Vélez A. Elucidation of the mTOR Pathway and Therapeutic Applications in Dermatology. *Actas Dermo-*

- Sifiliográficas* (English Edition). 2016;107(5):379-390. doi:10.1016/j.adengl.2016.03.001.
96. Buerger C, Malisiewicz B, Eiser A, Hardt K, Boehncke WH. Mammalian target of rapamycin and its downstream signalling components are activated in psoriatic skin. *British Journal of Dermatology*. 2013;169(1):156-159. doi:10.1111/bjd.12271.
97. Buerger C, Shirsath N, Lang V, et al. Inflammation dependent mTORC1 signaling interferes with the switch from keratinocyte proliferation to differentiation. *PLoS ONE*. 2017;12(7):e0180853. doi:10.1371/journal.pone.0180853.
98. Harrison DA. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(3). doi:10.1101/cshperspect.a011205.
99. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009;228(1):273-287. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x.
100. Howell MD, Kuo FI, Smith PA. Targeting the Janus Kinase Family in Autoimmune Skin Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:2342. doi:10.3389/fimmu.2019.02342.
101. Dodington DW, Desai HR, Woo M. JAK/STAT - Emerging Players in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(1):55-65. doi:10.1016/j.tem.2017.11.001.
102. Calautti E, Avalle L, Poli V. Psoriasis: A STAT3-Centric View. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1). doi:10.3390/ijms19010171.
103. 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(6):461-467. doi:10.1007/s11926-007-0075-1.
104. Morelli M, Scarponi C, Mercurio L, et al. Selective Immunomodulation of Inflammatory Pathways in Keratinocytes by the Janus Kinase (JAK) Inhibitor Tofacitinib: Implications for the Employment of JAK-Targeting Drugs in Psoriasis. *J Immunol Res*. 2018;2018:7897263. doi:10.1155/2018/7897263.
105. Huang G, Yan H, Ye S, Tong C, Ying Q-L. STAT3 phosphorylation at tyrosine 705 and serine 727 differentially regulates mouse ESC fates. *Stem Cells*. 2014;32(5):1149-1160. doi:10.1002/stem.1609.
106. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*. 2000;19(21):2628-2637. doi:10.1038/sj.onc.1203481.

107. Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 8):1713-1719. doi:10.1242/jcs.125773.
108. Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current Biology.* 2000;10(1):47-50. doi:10.1016/S0960-9822(99)00268-7.
109. Kim J-H, Yoon M-S, Chen J. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mediates amino acid inhibition of insulin signaling through serine 727 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2009;284(51):35425-35432. doi:10.1074/jbc.M109.051516.
110. Frew JW, Hawkes JE, Krueger JG. A systematic review and critical evaluation of inflammatory cytokine associations in hidradenitis suppurativa. *F1000Res.* 2018;7:1930. doi:10.12688/f1000research.17267.1.
111. Frew JW. Hidradenitis suppurativa is an autoinflammatory keratinization disease: A review of the clinical, histologic, and molecular evidence. *JAAD International.* 2020;1(1):62-72. doi:10.1016/j.jdin.2020.05.005.
112. Vita V de, McGonagle D. Hidradenitis suppurativa as an autoinflammatory keratinization disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(5):1953. doi:10.1016/j.jaci.2018.01.010.
113. Baliwag J, Barnes DH, Johnston A. Cytokines in psoriasis. *Cytokine.* 2015;73(2):342-350. doi:10.1016/j.cyto.2014.12.014.
114. Victor FC, Gottlieb AB. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol.* 2002;1(3):264-275.
115. Buerger C, Richter B, Woth K, et al. Interleukin-1 β interferes with epidermal homeostasis through induction of insulin resistance: implications for psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2012;132(9):2206-2214. doi:10.1038/jid.2012.123.
116. Kelly G, Hughes R, McGarry T, et al. Dysregulated cytokine expression in lesional and nonlesional skin in hidradenitis suppurativa. *British Journal of Dermatology.* 2015;173(6):1431-1439. doi:10.1111/bjd.14075.
117. Jiménez-Gallo D, La Varga-Martínez R de, Ossorio-García L, Albarrán-Planelles C, Rodríguez C, Linares-Barrios M. The Clinical Significance of

- Increased Serum Proinflammatory Cytokines, C-Reactive Protein, and Erythrocyte Sedimentation Rate in Patients with Hidradenitis Suppurativa. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:2450401. doi:10.1155/2017/2450401.
118. Witte-Händel E, Wolk K, Tsaousi A, et al. The IL-1 Pathway Is Hyperactive in Hidradenitis Suppurativa and Contributes to Skin Infiltration and Destruction. *J Invest Dermatol.* 2019;139(6):1294-1305. doi:10.1016/j.jid.2018.11.018.
119. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106(3):761-771. doi:10.1083/jcb.106.3.761.
120. 8 Psoriasis und das Immunsystem. In: Elsner P, Norgauer J, eds. *Psoriasis*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
121. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Phys.* 2000;182(3):311-322. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311:AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
122. Yang H, Parkhouse RME, Wileman T. Monoclonal antibodies that identify the CD3 molecules expressed specifically at the surface of porcine gammadelta-T cells. *Immunology.* 2005;115(2):189-196. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02137.x.
123. Harhous Z, Booz GW, Ovize M, Bidaux G, Kurdi M. An Update on the Multifaceted Roles of STAT3 in the Heart. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:150. doi:10.3389/fcvm.2019.00150.
124. Monfrecola G, Balato A, Caiazza G, et al. Mammalian target of rapamycin, insulin resistance and hidradenitis suppurativa: a possible metabolic loop. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(9):1631-1633. doi:10.1111/jdv.13233.
125. Vita V de, Melnik BC. Activated mTORC1 signaling: The common driving force of type 2 diabetes and hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78(5):e121. doi:10.1016/j.jaad.2017.11.061.
126. Balato A, Caiazza G, Annunziata MC, et al. Anti-TNF- α therapy modulates mTORC1 signalling in hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33(1):e43-e45. doi:10.1111/jdv.15160.

127. Antikainen H, Driscoll M, Haspel G, Dobrowolski R. TOR-mediated regulation of metabolism in aging. *Aging Cell*. 2017;16(6):1219-1233. doi:10.1111/accel.12689.
128. Lee D-F, Kuo H-P, Chen C-T, et al. IKKbeta suppression of TSC1 function links the mTOR pathway with insulin resistance. *Int J Mol Med*. 2008;22(5):633-638. doi:10.3892/ijmm_00000065.
129. Balevi A, Ustuner P, Özdemir M. The efficacy of adalimumab in the treatment of hidradenitis suppurativa. *Dicle Tıp Dergisi*. 2018:19-27. doi:10.5798/dicletip.407240.
130. Moneva-Leniz LM, Garcia-Ruiz R, Sanchez-Martinez EM, Gegundez-Hernandez H, Melgosa-Ramos FJ, Mateu-Puchades A. Efectividad de adalimumab en la hidradenitis supurativa: un estudio de la vida real. *Piel*. 2020;35(8):479-483. doi:10.1016/j.piel.2020.01.003.
131. Orvain C, Lin Y-L, Jean-Louis F, et al. Hair follicle stem cell replication stress drives IFI16/STING-dependent inflammation in hidradenitis suppurativa. *J Clin Invest*. 2020;130(7):3777-3790. doi:10.1172/JCI131180.
132. Frew JW, Hawkes JE, Krueger JG. A systematic review and critical evaluation of immunohistochemical associations in hidradenitis suppurativa. *F1000Res*. 2018;7:1923. doi:10.12688/f1000research.17268.2.
133. Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. mTOR Signaling Cascade in Psoriatic Disease: Double Kinase mTOR Inhibitor a Novel Therapeutic Target. *Indian J Dermatol*. 2014;59(1):67-70. doi:10.4103/0019-5154.123499.
134. Kurokawa I, Nishijima S, Kusumoto K, Senzaki H, Shikata N, Tsubura A. Immunohistochemical study of cytokeratins in hidradenitis suppurativa (acne inversa). *J Int Med Res*. 2002;30(2):131-136. doi:10.1177/147323000203000205.
135. Kurzen H, Jung EG, Hartschuh W, Moll I, Franke WW, Moll R. Forms of epithelial differentiation of draining sinus in acne inversa (hidradenitis suppurativa). *British Journal of Dermatology*. 1999;141(2):231-239. doi:10.1046/j.1365-2133.1999.02970.x.
136. Blagosklonny MV. TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists. *Cell Death Dis*. 2013;4:e964. doi:10.1038/cddis.2013.506.

137. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E581-91. doi:10.1152/ajpendo.90437.2008.
138. Yoon M-S. The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling. *Nutrients*. 2017;9(11). doi:10.3390/nu911176.
139. Hügl SR, White MF, Rhodes CJ. Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem*. 1998;273(28):17771-17779. doi:10.1074/jbc.273.28.17771.
140. Linnemann AK, Baan M, Davis DB. Pancreatic β -cell proliferation in obesity. *Adv Nutr*. 2014;5(3):278-288. doi:10.3945/an.113.005488.
141. Marasca C, Balato A, Annunziata MC, Cacciapuoti S, Fabbrocini G. Insulin resistance, mTOR and hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(3):e106-e107. doi:10.1111/jdv.15271.
142. Bui T-L, Silva-Hirschberg C, Torres J, Armstrong AW. Hidradenitis suppurativa and diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(2):395-402. doi:10.1016/j.jaad.2017.08.042.
143. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*. 2005;146(3):1473-1481. doi:10.1210/en.2004-0921.
144. Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. Interleukin-17 as a factor linking the pathogenesis of psoriasis with metabolic disorders. *Int J Dermatol*. 2017;56(3):260-268. doi:10.1111/ijd.13420.
145. Casseres RG, Prussick L, Zancanaro P, et al. Secukinumab in the treatment of moderate to severe hidradenitis suppurativa: Results of an open-label trial. *J Am Acad Dermatol*. 2020;82(6):1524-1526. doi:10.1016/j.jaad.2020.02.005.
146. Vodenik B, Rovira J, Campistol JM. Mammalian target of rapamycin and diabetes: what does the current evidence tell us? *Transplant Proc*. 2009;41(6 Suppl):S31-8. doi:10.1016/j.transproceed.2009.06.159.

147. Mayorbre ML, Veuthey F, Rous S, Favarger P. Production rapide d'une carence en biotine chez la souris. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1975;169(4):892-898.
148. Bezzerra V, Vella A, Calcaterra E, et al. New insights into the Shwachman-Diamond Syndrome-related haematological disorder: hyper-activation of mTOR and STAT3 in leukocytes. *Sci Rep.* 2016;6:33165. doi:10.1038/srep33165.
149. Kusaba H, Ghosh P, Derin R, et al. Interleukin-12-induced interferon-gamma production by human peripheral blood T cells is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem.* 2005;280(2):1037-1043. doi:10.1074/jbc.M405204200.
150. Kajiwara M, Masuda S. Role of mTOR Inhibitors in Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060975.
151. Reitamo S, Spuls P, Sassolas B, Lahfa M, Claudy A, Griffiths CE. Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology.* 2001;145(3):438-445. doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04376.x.
152. Huang T, Lin X, Meng X, Lin M. Phosphoinositide-3 kinase/protein kinase-B/mammalian target of rapamycin pathway in psoriasis pathogenesis. A potential therapeutic target? *Acta Derm Venereol.* 2014;94(4):371-379. doi:10.2340/00015555-1737.
153. Wei K-C, Lai P-C. Combination of everolimus and tacrolimus: a potentially effective regimen for recalcitrant psoriasis. *Dermatol Ther.* 2015;28(1):25-27. doi:10.1111/dth.12176.
154. Ormerod AD, Shah SAA, Copeland P, Omar G, Winfield A. Treatment of psoriasis with topical sirolimus: preclinical development and a randomized, double-blind trial. *British Journal of Dermatology.* 2005;152(4):758-764. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06438.x.
155. Hausch F, Kozany C, Theodoropoulou M, Fabian A-K. FKBP and the Akt/mTOR pathway. *Cell Cycle.* 2013;12(15):2366-2370. doi:10.4161/cc.25508.

156. Bürger C, Shirsath N, Lang V, et al. Blocking mTOR Signalling with Rapamycin Ameliorates Imiquimod-induced Psoriasis in Mice. *Acta Derm Venereol.* 2017;97(9):1087-1094. doi:10.2340/00015555-2724.
157. Bettuzzi T, Frumholtz L, Jachiet M, et al. Sirolimus as combination rescue therapy with tumor necrosis alpha inhibitors for severe, refractory hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol.* 2020. doi:10.1016/j.jaad.2020.06.042.
158. Gottlieb J, Madrange M, Gardair C, et al. PAPASH, PsAPASH and PASS autoinflammatory syndromes: phenotypic heterogeneity, common biological signature and response to immunosuppressive regimens. *British Journal of Dermatology.* 2019;181(4):866-869. doi:10.1111/bjd.18003.
159. Rumberger BE, Boarder EL, Owens SL, Howell MD. Transcriptomic analysis of hidradenitis suppurativa skin suggests roles for multiple inflammatory pathways in disease pathogenesis. *Inflamm Res.* 2020. doi:10.1007/s00011-020-01381-7.
160. Sano S, Chan KS, Carbajal S, et al. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med.* 2005;11(1):43-49. doi:10.1038/nm1162.
161. Wolk K, Haugen HS, Xu W, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med.* 2009;87(5):523-536. doi:10.1007/s00109-009-0457-0.
162. Orecchia V, Regis G, Tassone B, et al. Constitutive STAT3 activation in epidermal keratinocytes enhances cell clonogenicity and favours spontaneous immortalization by opposing differentiation and senescence checkpoints. *Exp Dermatol.* 2015;24(1):29-34. doi:10.1111/exd.12585.
163. Nakajima K, Kataoka S, Sato K, et al. Stat3 activation in epidermal keratinocytes induces Langerhans cell activation to form an essential circuit for psoriasis via IL-23 production. *J Dermatol Sci.* 2019;93(2):82-91. doi:10.1016/j.jdermsci.2018.11.007.
164. Eidsmo L, Martini E. Human Langerhans Cells with Pro-inflammatory Features Relocate within Psoriasis Lesions. *Front Immunol.* 2018;9:300. doi:10.3389/fimmu.2018.00300.
165. Gadina M, Chisolm DA, Philips RL, McInness IB, Changelian PS, O'Shea JJ. Translating JAKs to Jakinibs. *J Immunol.* 2020;204(8):2011-2020. doi:10.4049/jimmunol.1901477.

166. Savage KT, Santillan MR, Flood KS, Charrow A, Porter ML, Kimball AB. Tofacitinib shows benefit in conjunction with other therapies in recalcitrant hidradenitis suppurativa patients. *JAAD Case Rep.* 2020;6(2):99-102. doi:10.1016/j.jdc.2019.10.010.
167. Harrison C, Vannucchi AM. Ruxolitinib: a potent and selective Janus kinase 1 and 2 inhibitor in patients with myelofibrosis. An update for clinicians. *Ther Adv Hematol.* 2012;3(6):341-354. doi:10.1177/2040620712459746.
168. Scala E, Cacciapuoti S, Garzorz-Stark N, et al. Hidradenitis Suppurativa: Where We Are and Where We Are Going. *Cells.* 2021;10(8). doi:10.3390/cells10082094.