

**Untersuchung der molekularen Wirkung von Rifampicin in
Zellkulturmodellen der *Hidradenitis Suppurativa***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Isabel Haferland
aus Winsen/Luhe

Frankfurt am Main, 2024

(D 30)

Vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie

Johann Wolfgang Goethe – Universität Frankfurt als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Jochen Klein
PD. Dr. Pinter

Datum der Disputation: 27.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie der Haut	1
1.2 Ätiologie und Pathophysiologie der <i>Hidradenitis suppurativa</i>	5
1.3 Behandlungsmöglichkeiten der <i>Hidradenitis suppurativa</i>	11
1.4 Rifampicin in der Therapie der <i>Hidradenitis suppurativa</i>	13
1.5 Forschung in der <i>Hidradenitis suppurativa</i>	15
1.6 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Materialien	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Zellen, Medien, Zusätze und Enzyme für die Zellkultur	22
2.1.3 Reagenzien/Größenstandards/verwendete Kits	24
2.1.4 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen.....	25
2.1.5 Gelzusammensetzung Westernblot.....	27
2.1.6 Antikörper für Westernblot.....	28
2.1.7 Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	28
2.1.8 Geräte	29
2.1.9 Programme	30
2.1.10 Verbrauchsmaterialien	30
2.2 Zellbiologische Methoden	31
2.2.1 Ethik.....	31
2.2.2 Kultivierung von Zellen	32
2.2.3 Kultivierung adhärent wachsender Zellen.....	32
2.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	32
2.2.5 Behandlung adhärent wachsender Zellen	33
2.2.6 Isolation primärer Keratinozyten und Fibroblasten.....	33
2.2.7 Kultivierung von Epidermismodellen.....	34
2.2.8 Präparation und Kultivierung von <i>ex vivo</i> Explantatkulturen	35
2.3 Proteinbiochemische Methoden	36
2.3.1 Präparation von Zelllysaten	36
2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford.....	36

2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.3.4	Westernblot-Analyse	37
2.4	Antikörperfärbungen auf Paraffinschnitten	38
2.4.1	Vorbereitung der Paraffinblöcke	38
2.4.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung	39
2.4.3	Immunhistochemische Färbungen.....	40
2.4.4	CD4 Immunfluoreszenzfärbung	41
2.4.5	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	42
2.5	Toxizitätsbestimmungen	43
2.5.1	Zell-Proliferations-Reagent WST-1	43
2.5.2	Laktat Dehydrogenase Assay.....	43
2.6	Zytokin Messungen.....	44
2.6.1	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	44
2.6.2	<i>Cytometric Bead Assay</i>	45
2.7	Rifampicin-Nanoformulierung.....	46
2.8	Statistische Auswertung	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Etablierung von <i>Hidradenitis suppurativa</i> Zellkulturmodellen.....	47
3.1.1	Epidermale Differenzierung bei <i>Hidradenitis suppurativa</i>	47
3.1.2	<i>Hidradenitis suppurativa</i> Epidermismodelle	49
3.1.3	<i>Ex vivo</i> Explantate.....	51
3.2	<i>In vitro</i> Behandlungen mit Rifampicin	53
3.2.1	Toxizität einer Rifampicinbehandlung	54
3.2.2	Immunmodulierende Wirkung einer Rifampicinbehandlung	56
3.3	Behandlungen mit der Rifampicin-Nanoformulierung	65
3.3.1	Toxizität der Rifampicin-Nanoformulierung.....	65
3.3.2	Immunmodulierende Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung.....	68
4	Diskussion.....	72
4.1	Etablierung von <i>Hidradenitis suppurativa</i> Zellkulturmodellen.....	72
4.1.1	<i>Hidradenitis suppurativa</i> Epidermismodelle	72
4.1.2	<i>Ex vivo</i> Explantate.....	75
4.2	Rifampicinbehandlung in Zellkulturmodellen der <i>Hidradenitis suppurativa</i>	77
4.2.1	Nanocarrier als Applikationsform bei mild ausgeprägten Dermatosen – zukünftige topische Anwendung bei milder <i>Hidradenitis suppurativa</i> ?.....	77
4.2.2	Toxizität von Rifampicin	79
4.2.3	Immunmodulierende Wirkung und Wirksamkeit von Rifampicin	83
4.3	Fazit und Ausblick.....	89
5	Zusammenfassung.....	91

6	Summary.....	93
7	Anhang.....	95
7.1	Apoptoseinduktion in primären Fibroblasten	95
7.2	Toxizität einer <i>in vitro</i> Rifampicinbehandlung in <i>ex vivo</i> Explantaten	96
7.3	Immunmodulierende Wirkung einer <i>in vitro</i> Rifampicinbehandlung in <i>ex vivo</i> Explantaten	100
7.4	Toxizität der Rifampicin-Nanoformulierung in Epidermismodellen	101
7.5	Toxizität der Rifampicin-Nanoformulierung in <i>ex vivo</i> Explantaten	103
7.6	Immunmodulierende Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung in <i>ex vivo</i> Explantaten	104
	Literaturverzeichnis	105
	Publikationsliste.....	121
	Erklärung Eigenleistung Dissertation	122
	Eidesstattliche Erklärung	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut.	1
Abbildung 2: Schematischer Querschnitt der Epidermis.	3
Abbildung 3: Schematischer Querschnitt einer Haarfollikel-Einheit.....	4
Abbildung 4: Veranschaulichung der Schweregradeinteilung nach Hurley von <i>Hidradenitis suppurativa</i> Läsionen.	6
Abbildung 5: Behandlungsalgorithmus zur Behandlung der <i>Hidradenitis suppurativa</i> nach der Europäischen S1 Leitlinie.....	12
Abbildung 6: Strukturformel von Rifampicin. Erstellt mit Chemograph.	14
Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen von isolierten Keratinozyten und Fibroblasten aus läSIONalen <i>Hidradenitis suppurativa</i> Gewebe.....	16
Abbildung 8: Zeitschema der Herstellung von Epidermismodellen.....	35
Abbildung 9: Präparation von <i>ex vivo</i> Explantatkulturen.	36
Abbildung 10: Epidermale Differenzierung von nicht entzündlichen und läSIONalen <i>Hidradenitis suppurativa</i> Biopsien.	48
Abbildung 11: Epidermale Differenzierung der Epidermismodelle aus <i>Präputium</i> und <i>Hidradenitis suppurativa</i>	50
Abbildung 12: Inflammatorisches Profil der Epidermismodelle aus <i>Präputium</i> und <i>Hidradenitis suppurativa</i>	51
Abbildung 13: Kultivierungseinfluss auf die Morphologie von nicht entzündlichen und <i>Hidradenitis suppurativa ex vivo</i> Explantaten.....	52
Abbildung 14: Kultivierungseinfluss auf die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten in nicht entzündlichen und <i>Hidradenitis suppurativa ex vivo</i> Explantaten.....	53
Abbildung 15: Zellviabilität von HaCaT und NIH 3T3 nach 2-stündiger Rifampicinbehandlung.	54
Abbildung 16: Wirkung einer Rifampicinbehandlung unter proinflammatorischen Bedingungen auf die <i>Toll-like</i> Rezeptor 2-Proteinexpression.	57
Abbildung 17: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf die Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 β Ausschüttung von <i>ex vivo</i> Explantaten gemessen mittels <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	58
Abbildung 18: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf die Tumornekrosefaktor und Interleukin-1 β Ausschüttung von <i>ex vivo</i> Explantaten gemessen mittels <i>Cytometric Bead Assay</i>	58
Abbildung 19: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf die Interleukin-6, Interleukin-8 und Interleukin-10 Ausschüttung von <i>ex vivo</i> Explantaten.....	59
Abbildung 20: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf Tumornekrosefaktor- α (+), Interleukin-1 β (+) und Interleukin-8(+) Zellen im <i>Stratum papillare</i> der Dermis von <i>ex vivo</i> Explantaten.....	60
Abbildung 21: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf CD3(+)-T-Zellen im <i>Stratum</i> <i>papillare</i> der Dermis in <i>ex vivo</i> Explantaten.	61
Abbildung 22: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf CD4(+)-T-Zellen im <i>Stratum</i> <i>papillare</i> der Dermis in <i>ex vivo</i> Explantaten.	62
Abbildung 23: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf neutrophile Granulozyten im <i>Stratum papillare</i> der Dermis in <i>ex vivo</i> Explantaten.	63

Abbildung 24: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf <i>Toll-like</i> Rezeptor 2(+) Zellen im <i>Stratum papillare</i> der Dermis in <i>ex vivo</i> Explantaten.	64
Abbildung 25: Kultivierungseinfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Morphologie von Epidermismodellen.	66
Abbildung 26: Zytotoxizität der Rifampicin-Nanoformulierung auf Epidermismodelle.	67
Abbildung 27: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Interleukin-1 β Ausschüttung von <i>ex vivo</i> Explantaten.	68
Abbildung 28: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf CD3(+)-T-Zellen im <i>Stratum papillare</i> der Dermis in <i>ex vivo</i> Explantaten.	69
Abbildung 29: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf CD4(+)-T-Zellen im <i>Stratum papillare</i> der Dermis in <i>ex vivo</i> Explantaten.	70
Abbildung 30: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf neutrophile Granulozyten im <i>Stratum papillare</i> der Dermis in <i>ex vivo</i> Explantaten.	71
Abbildung 31: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf <i>Toll-like</i> Rezeptor 2(+) Zellen im <i>Stratum papillare</i> der Dermis in <i>ex vivo</i> Explantaten.	71
Abbildung 32: <i>Cleaved Caspase 3</i> Proteinexpression in primären Fibroblasten.	95
Abbildung 33: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Morphologie von nicht entzündlichen und <i>Hidradenitis suppurativa ex vivo</i> Explantaten.	96
Abbildung 34: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten in <i>ex vivo</i> Explantaten aus nicht entzündlicher Haut und <i>Hidradenitis suppurativa</i>	97
Abbildung 35: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Apoptoseinduktion in der Epidermis von <i>ex vivo</i> Explantaten aus nicht entzündlicher Haut und <i>Hidradenitis suppurativa</i>	98
Abbildung 36: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Apoptoseinduktion in der Dermis von <i>ex vivo</i> Explantaten aus nicht entzündlicher Haut und <i>Hidradenitis suppurativa</i>	99
Abbildung 37: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf den <i>Toll-like</i> Rezeptor 2 in der Epidermis von <i>ex vivo</i> Explantaten.	100
Abbildung 38: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten in Epidermismodellen.	101
Abbildung 39: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Apoptoseinduktion in Epidermismodellen.	101
Abbildung 40: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Differenzierung von Keratinozyten in Epidermismodellen.	102
Abbildung 41: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Morphologie von <i>ex vivo</i> Explantaten.	103
Abbildung 42: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten in <i>ex vivo</i> Explantaten.	103
Abbildung 43: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Apoptoseinduktion in <i>ex vivo</i> Explantaten.	104
Abbildung 44: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf den <i>Toll-like</i> Rezeptor 2 in der Epidermis in <i>ex vivo</i> Explantaten.	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktionen der CD4-T-Zellen (mod. nach Sabat <i>et al.</i> 2019 sowie Zhu und Zhu 2020)	9
Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien.....	20
Tabelle 3: Verwendete Zellen	22
Tabelle 4: Fertig-Medien für die Zellkultur.....	22
Tabelle 5: Zusätze und Enzyme für die Zellkultur	23
Tabelle 6: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	23
Tabelle 7: Reagenzien, Größenstandards und verwendete Kits	24
Tabelle 8: Gelzusammensetzung für Westernblot	27
Tabelle 9: Primärantikörper für Westernblot	28
Tabelle 10: Sekundärantikörper für Westernblot.....	28
Tabelle 11: Primärantikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	28
Tabelle 12: Sekundärantikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	29
Tabelle 13: Verwendete Geräte	29
Tabelle 14: Verwendete Programme	30
Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 16: Zelldichte/mL für die Versuchsaufbauten	33
Tabelle 17: Lösungen und Verdünnungsfaktor für die immunhistochemischen Färbungen...41	

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zellen	B-Lymphozyten
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HS	<i>Hidradenitis suppurativa</i>
IL	Interleukin
Ki-67	Marker für die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NFκB	<i>nuclear factor κ of activated B cells</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat-buffered saline</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
St	Staurosporin
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T-Zellen	T-Lymphozyten
WST	<i>Water Soluble tetrazolium</i>

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Haut

Die Haut (*Cutis*) macht ungefähr $\frac{1}{6}$ des Gesamtkörpergewichts eines Erwachsenen aus und ist damit das größte Organ des menschlichen Körpers (1,2). Sie besteht aus verschiedenen Strukturen, die in drei Schichten, von unten nach oben, angeordnet sind: Hypodermis, Dermis und Epidermis (Abbildung 1). Außerdem sind in diese Strukturen auch die Hautanhangsgebilde Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen eingebettet. (1,3) Gemeinsam bieten diese einen Schutz gegen verschiedene Umwelteinflüsse und verhindern gleichzeitig den Verlust von Wasser und anderen Komponenten an die Umwelt. Neben der Barrierefunktion übt die Haut weitere wichtige Aufgaben, wie Immunabwehr, Sinnesfunktionen, Stoffwechsel und Regulation der Körpertemperatur, aus (2,3).

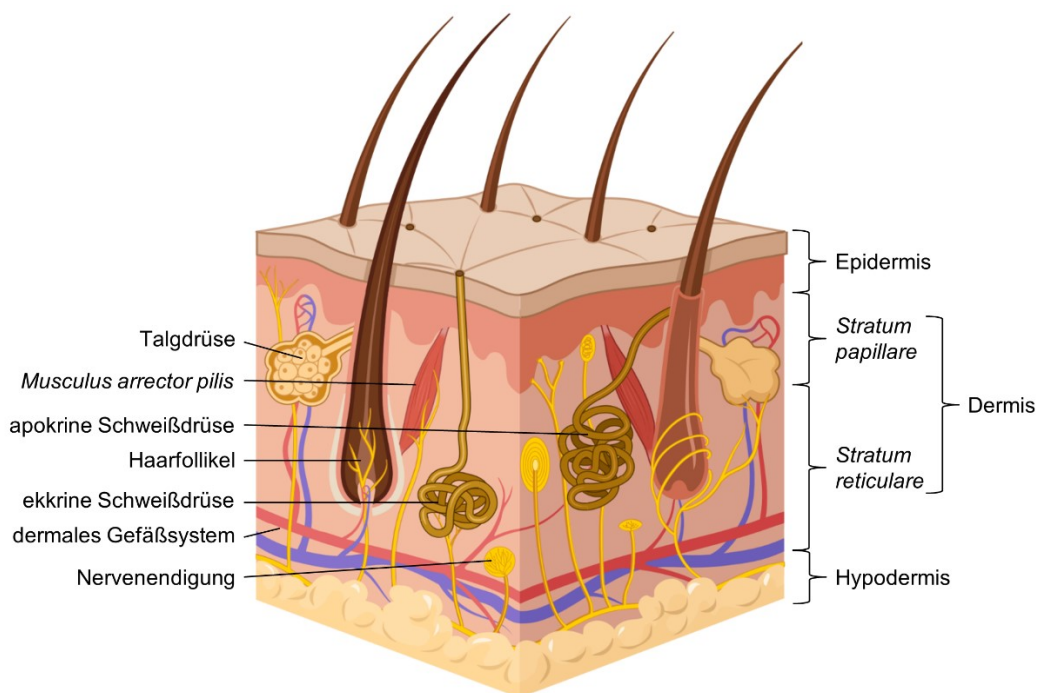


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut.

Die Haut setzt sich von innen nach außen aus den drei Schichten Hypodermis, Dermis und Epidermis zusammen. In der Hypodermis verläuft das dermale Blutgefäßsystem, welches sich zur Dermis und Epidermis zu einem Kapillarnetzwerk verzweigt. Auch die funktionellen Einheiten der Haut, die Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen, haben ihren Ursprung in der Dermis. Daneben sind Nervenendigungen in der Dermis zu finden, welche ihre Reize über Nervenbahnen weiterleiten. Erstellt mit BioRender.com.

Die Hypodermis, auch *Subcutis* genannt, besteht aus lockerem Bindegewebe, Fibroblasten, Makrophagen und Adipozyten. Diese Schicht wird von größeren Nervenbahnen und Blutgefäßen durchzogen, welche über ein Kapillarnetz die darüber liegenden Schichten mit

Nährstoffen versorgen. (1,4,5) Bindegewebsfasern und Kollagen der aufliegenden Dermis verschmelzen mit denen der Hypodermis. Die Dermis ist ein unterstützendes und elastisches Gewebe, das neben Bindegewebe, Kollagen und Zellen die extrazelluläre Matrix aufweist. (1,3,4) Fibroblasten machen in dieser Schicht den größten Teil der Zellen aus. Sie synthetisieren die verschiedenen Fasern der Dermis (1,3) und sind am Wundheilungsprozess beteiligt. (1,3,6) Weitere Zellen der Dermis sind zumeist immunologischer Natur und schließen unterschiedliche Untergruppen von T-Lymphozyten (T-Zellen) und Dendritischen Zellen ein, welche in der Nähe von Epithel und Haarfollikeln anzutreffen sind. Die Dermis lässt sich in zwei Schichten gliedern: Das tiefliegende *Stratum reticulare* und das oberflächliche *Stratum papillare*. Im *Stratum reticulare* haben die Schweißdrüsen und Haarfollikel ihren Ursprung. (1) Das dem *Stratum reticulare* aufliegende *Stratum papillare* ist eine dünne Schicht aus losen elastischen Fasern, durchzogen von Mechanorezeptoren (1,4) sowie Kapillaren, welche die Körpertemperatur regulieren und die avaskuläre Epidermis mit Nährstoffen versorgen. (4,7) Optimiert wird dieser Mechanismus durch die sich mit den epidermalen Reteleisten abwechselnden *Papillaren* der Dermis. Dadurch vergrößert sich die Oberfläche zwischen Dermis und Epidermis und gewährleistet gleichzeitig die mechanische Festigkeit der Haut. (1,7) Die zwischen Dermis und Epidermis befindliche Basalmembran verbindet die Dermis mit der aufliegenden Basalschicht (*Stratum basale*) der Epidermis. (1)

Die Epidermis besteht aus mehreren Schichten, die in folgender Reihenfolge zur Hautoberfläche hin organisiert sind: *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* (Abbildung 2). (1,3,8) In der untersten Schicht der Epidermis, dem *Stratum basale*, sind die Stammzellen enthalten, die für die ständige Erneuerung der Epidermis verantwortlich sind. (1,4) Die Keratinozyten sind ektodermalen Ursprungs und durchlaufen einen Differenzierungsprozess, bei dem es zur asymmetrischen Teilung von Stammzellen im *Stratum basale* kommt. Eine der beiden Tochterzellen migriert zur Hautoberfläche und differenziert dabei terminal zu einer abgeflachten kernlosen Zelle aus, dem Korneozyt. Die zweite verbleibt währenddessen im *Stratum basale*. Im Laufe dieses Prozesses verändert sich die Zelle biochemisch sowie morphologisch und wird schließlich desquamiert. (1,3,9,10) Neben Keratinozyten, sind in dieser Hautschicht Melanozyten und Merkel-Zellen zu finden. Melanozyten produzieren das Hautpigment Melanin. Das Melanin wird in das Zytoplasma der Keratinozyten freigesetzt, wo es sich supranukleär sammelt und so die im Kern enthaltene DNA vor ultraviolettem Licht schützt. Merkel-Zellen dienen als intraepidermale Mechanorezeptoren. Das aufliegende *Stratum spinosum* besteht aus mehreren Keratinozyten-Schichten. (1,4) Sie synthetisieren Tonofibrillen aus Keratin, welche einen Teil des Zytoskeletts darstellen. Dies wird durch die Dornverlängerungen der Zellen

begünstigt, weshalb diese Schicht auch Stachelschicht genannt wird. (4) In dieser Schicht warten unreife Langerhans-Zellen bis sie in Kontakt mit einem Antigen treten können. Sie nehmen im *Stratum spinosum* exogene Antigene auf, verarbeiten diese und präsentieren sie anschließend den naiven T-Zellen in den Lymphknoten. (1,4,11) Die Zellen des *Stratum granulosum* haben ihre terminale Zelldifferenzierung in der obersten Schicht des *Stratum spinosum* durchlaufen. Ihr Zytoplasma besteht aus Keratohyalin-Granulat, welches Filaggrin und weitere Proteine beinhaltet, die mit Keratinen der Tonofibrillen verwandt sind. (4) Die oberste Schicht der Epidermis ist das physiologisch inaktive *Stratum corneum*, welches aus 15-20 Schichten abgeflachten Korneozyten besteht, die sich regelmäßig von der Oberfläche der Haut ablösen. Korneozyten sind anukleatisch und besitzen keine Zellorganellen, beinhalten dafür aber eine dichte Keratinmatrix. (1,4) Sie sind in einen Lipid-Mix aus Ceramiden, Cholesterin und Fettsäuren eingebettet, die der Epidermis ihre Elastizität und Festigkeit verleihen. (5) Während ihrer Differenzierung synthetisieren Keratinozyten spezifische Proteine wie Filaggrin, Involucrin und Keratin. Aber auch die Stammzellen des *Stratum basale* exprimieren entsprechende Proliferationsmarker wie Ki-67 und *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*. (1,9)

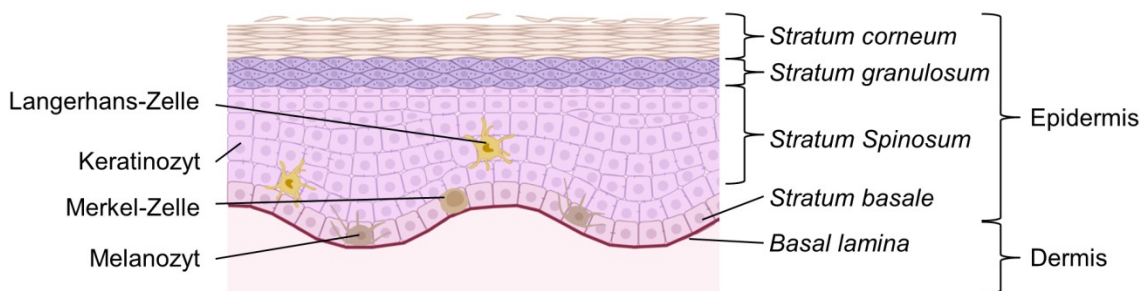


Abbildung 2: Schematischer Querschnitt der Epidermis.

Die auf der Dermis sitzende Epidermis setzt sich aus vier Schichten zusammen. Die unterste Schicht bildet das *Stratum basale*, in dem die teilungsfähigen Keratinozyten sitzen. Diese ist für die fortlaufende Regeneration der Haut verantwortlich. Neben Keratinozyten sind hier Melanozyten und Merkel-Zellen zu finden. Melanozyten schützen die Keratinozyten vor ultraviolettem Licht, indem sie Melanin an die umgebenen Keratinozyten abgeben. Merkel-Zellen weisen mechanosensorische Fähigkeiten auf und geben daher erfasste Druckintensitäten weiter. In der nachfolgenden Schicht, dem *Stratum spinosum*, beginnt für die Keratinozyten die terminale Differenzierung, bei der vermehrt Keratin eingelagert und Zellorganellen abgebaut werden. Als Bestandteil des Immunsystems agieren inaktive Langerhans-Zellen als Antigenpräsentierende Zellen im *Stratum spinosum*. Während der Verhornung sammeln sich im Zytoplasma der Keratinozyten des *Stratum granulosum* Keratohyalin-Granula an, welche im Verlauf des Verhornungsprozesses an Größe zunehmen. Nach Abschluss des Verhornungsprozesses, bleiben anukleäre, abgeflachte Korneozyten zurück, welche die oberste Hautschicht, das *Stratum corneum*, bilden. Erstellt mit BioRender.com.

Neben den verschiedenen Zellen umfasst die Haut zwei Struktureinheiten, die exokrinen Schweißdrüsen und die Haarfollikel. (1) Die Schweißdrüsen lassen sich in zwei Typen

einteilen: die ekkrinen und die apokrinen Schweißdrüsen. Während die ekkrinen Schweißdrüsen ubiquitär vorkommen, begrenzen sich die apokrinen Schweißdrüsen auf die axillaren und anogenitalen Arealen sowie den Bereich der Brustwarze. Die Talgdrüsen und Haarfollikel kommen, mit Ausnahme von Handflächen, Fußsohlen und Teilen der Genitalien, ubiquitär in der Haut vor. Sie liegen schräg in der Haut, wobei ihr tiefster Teil bis in die Dermis reicht. Die Haarzwiebel sitzt am untersten Bereich des Haarfollikels und enthält viele basophile Matrixzellen, die am Haarwachstum beteiligt sind. Die glockenartige Form der Haarzwiebel umhüllt die follikuläre Papille. Der Isthmus reicht bis zur Wulst, dies ist die Ansatzstelle des *Musculus arrector pilis*, welcher das Haar aufrecht stehen lässt. Das am oberen Teil befindliche Infundibulum erstreckt sich bis zur Öffnung des Talgdrüsengangs (Abbildung 3). Die Talgdrüsen befinden sich zwischen der Hautoberfläche, dem Haarfollikel und dem *Musculus arrector pili*. Die äußere Schicht bilden Basalzellen, während die Talgdrüse im Inneren mit mehreren Schichten Sebozyten ausgekleidet ist. Diese sind mit Lipiden beladen und haben ein schaumiges Zytoplasma. Da es sich bei den Talgdrüsen um holokrine Drüsen handelt, zerfallen die Sebozyten und bilden dadurch den Talg, welcher über einen kurzen Kanal in den Pilar Kanal abgegeben wird. (1)

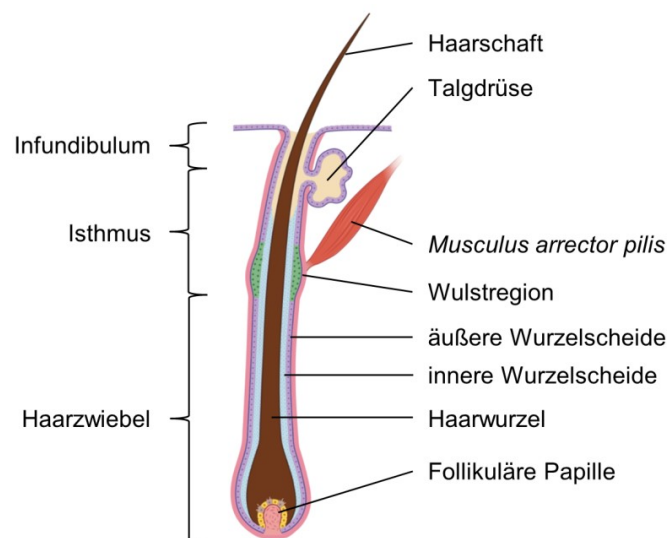


Abbildung 3: Schematischer Querschnitt einer Haarfollikel-Einheit.

Die Haarfollikel-Einheit besteht aus der in der Dermis ansässigen follikulären Papille, welche von der Haarzwiebel umschlossen ist. Hier befindliche Melanozyten geben ihre Pigmente an das entstehende Haar ab. Der Haarschaft bildet sich durch nach zur Hautoberfläche wandernde, keratinreiche Zellen. Umgeben ist dieser von einer inneren sowie äußeren Wurzelscheide. An der äußeren Wurzelscheide sitzt der Haaraufrichtemuskel, der *Musculus arrector pilis*, welcher für die bekannte Gänsehaut verantwortlich ist. Um die Haut vor Austrocknung zu schützen, sitzen zwischen dem kleinen Muskel und der Hautoberfläche die Talgdrüsen, deren Ausführungsgang zwischen Haarwurzel und Haarschaft mündet. Erstellt mit BioRender.com.

1.2 Ätiologie und Pathophysiologie der *Hidradenitis suppurativa*

Dermatosen gehören zu den häufigsten nicht-tödlichen Krankheiten weltweit, was dazu führt, dass 30 – 70 % der Menschen im Verlauf ihres Lebens von mindestens einer Hautkrankheit betroffen sind. (12,13) Eine dieser Dermatosen ist die *Hidradenitis suppurativa* oder auch *Akne inversa*, die im Jahr 1839 erstmals von Velpeau dokumentiert wurde. (14) Der französische Chirurg Verneuil publizierte 1854, dass die Krankheit mit einer Entzündung der Schweißdrüsen zu assoziieren sei und gab ihr den Namen „*Hidrosadenite Phlegmonous*“, englisch *Hidradenitis suppurativa*. (15) Etwa ein Jahrhundert später identifizierte Brunsting die apokrinen Schweißdrüsen als Ursprung der Entzündung und widerlegte damit die bisher angenommene These der Entzündung der ekkrinen Schweißdrüsen. (16) Der Begriff *Akne inversa* wurde von Plewig und Steger 1989 geprägt, um den pathologisch irrtümlichen Begriff *Hidradenitis suppurativa* zu ersetzen. (17) Jedoch spiegeln beide Namen, *Akne inversa* und *Hidradenitis suppurativa*, die pathologischen Prozesse der Krankheit nicht korrekt wider. Daher wurde beschlossen beide Namen synonym zu verwenden, bis ein der Pathogenese besser entsprechende Begriff gefunden wird. (18)

Die *Hidradenitis suppurativa* ist eine multifaktoriell bedingte, chronisch entzündliche Hauterkrankung der Haarfollikelalgdrüsen mit rezidivierendem Verlauf. (19) Die Prävalenz erstreckt sich zwischen 0,04 und 4 % der Weltbevölkerung. (20,21) Das Frauen-Männer-Verhältnis liegt bei 3:1 (22,23), wobei Männer häufig schwerer betroffen sind. (22) In der Regel beginnt die Erkrankung nach der Pubertät und erreicht in der dritten und vierten Lebensdekade ihren Aktivitätshöhepunkt. (22–24) Charakteristisch für das klinische Erscheinungsbild dieser Erkrankung sind zum Teil tiefsitzende, schmerzhaft entzündliche Knoten und Abszesse, bis hin zur Fistelgang- und Sinustraktbildung, was schließlich zu akkordeonartigen Narbenkontrakturen führen kann. Involvierte Körperareale bei Männern und Frauen sind zumeist auf Achseln, Leisten-, Anal- und Genitalregionen limitiert, wobei Frauen zusätzlich noch *submammär* betroffen sein können. (19) Anhand des klinischen Erscheinungsbildes wird zwischen drei Schweregraden nach Hurley unterschieden (Abbildung 4). Diese Einteilung wird für die Bewertung des Schweregrades im klinischen Alltag sowie für die Wahl der geeigneten Therapie herangezogen. (25)

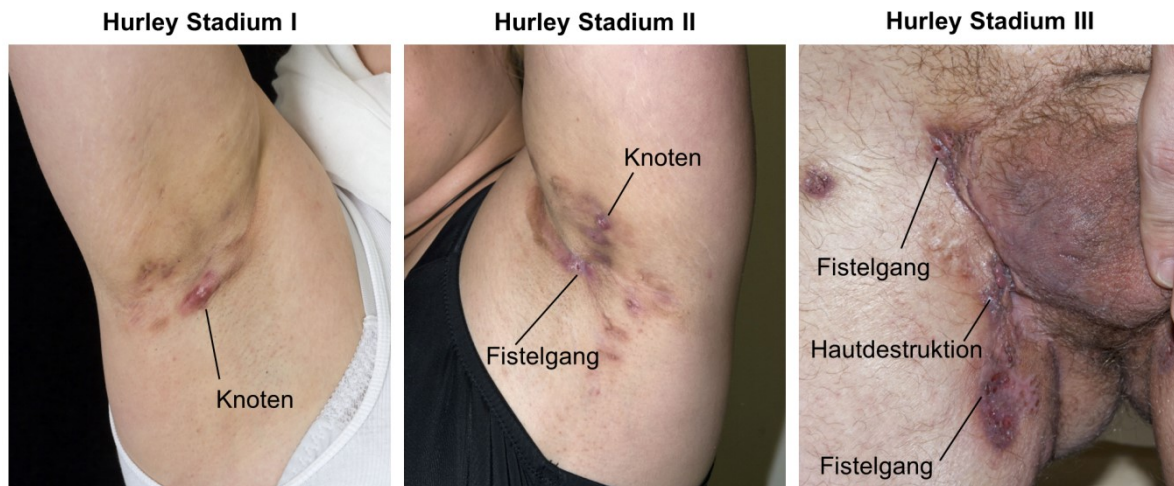


Abbildung 4: Veranschaulichung der Schweregradeinteilung nach Hurley von *Hidradenitis suppurativa* Läsionen.

Anhand der Schweregradeinteilung nach Hurley wird das klinische Bild der *Hidradenitis suppurativa* Läsionen in drei Schweregrade (Hurley Stadium I bis III) eingeteilt. Beim Hurley Stadium I sind nur einzelne oder mehrere isolierte Abszesse oder Knoten zu finden, keine Fistelgänge oder Narben. Betroffene Personen mit dem Hurley Stadium II weisen einzelne oder mehrere auseinanderliegende Läsionen mit Fistelgängen auf. Als schwere Form wird das Hurley Stadium III bezeichnet, welches sich durch einen flächigen Befall mit multiplen Abszessen, Fistelgängen und Narbensträngen auszeichnet. (25) Die Fotos der Patientinnen und Patienten stehen beispielhaft für das klinische Bild der *Hidradenitis suppurativa* und stammen aus wissenschaftlichen Untersuchungen mit positivem Ethik-Votum 276/17 und 394/18 aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Abteilung für Klinische Forschung.

Die genaue Ätiologie und Pathophysiologie der *Hidradenitis suppurativa* sind noch nicht vollständig geklärt. Es werden jedoch eine Reihe prädisponierender Faktoren beschrieben, die genetischer oder lebensstilbedingter Natur sein können. So berichten mehr als 30 % der Erkrankten von einer positiven Familienanamnese. (26,27) Darüber hinaus wurde bei einer geringen Anzahl von Patientinnen und Patienten mit *Hidradenitis suppurativa* eine Mutation in Genen beobachtet, die für Untereinheiten der γ -Sekretase kodieren. (28) Der Verlust dieses Gens zeigte in Mäusen einen der *Hidradenitis suppurativa* sehr ähnlichen Phänotyp, was wiederum die Assoziation zwischen der Beeinträchtigung der γ -Sekretase und der *Hidradenitis suppurativa* bestärkt. (29,30) Neben der γ -Sekretase-Mutationen wurden weitere Mutationen bei Patientinnen und Patienten mit *Hidradenitis suppurativa* entdeckt. (31,32) Darunter ein Gen, welches den *pattern recognition* Rezeptor Pyrin kodiert und Bestandteil des Inflammasoms ist. (32) Zu den lebensstilbedingten Faktoren gehören Adipositas und Tabakkonsum. Übergewicht, welches einen der Faktoren des metabolischen Syndroms darstellt, wird bei 40 - 60 % der von *Hidradenitis suppurativa* Betroffenen beobachtet. (24,33) Die weiteren Faktoren des metabolischen Syndroms sind Hypertonie, Hyperglykämie und Dyslipidämie. (33) Diese Komorbiditäten werden ebenfalls gehäuft bei *Hidradenitis*

suppurativa Patientinnen und Patienten beobachtet (22–24), bei 40 % der Patientinnen und Patienten liegt sogar das metabolische Syndrom vor. (33,34) Klinische Daten zeigten außerdem, dass zwischen dem Body Mass Index, der *Hidradenitis suppurativa* und dem Schweregrad der Erkrankung ein Zusammenhang besteht; eine Gewichtsreduktion bei Patientinnen und Patienten mit *Hidradenitis suppurativa* korreliert positiv mit einer Verbesserung des Hautbildes. (35) Tabakkonsum ist unter *Hidradenitis suppurativa* Erkrankten weit verbreitet. Bis zu 90 % rauchen aktiv oder rauchten früher. (36) Neben den physischen Komorbiditäten, treten durch diese stigmatisierende und schmerzhafte Krankheit auch Angststörungen und Depressionen auf, welche die Lebensqualität zusätzlich beträchtlich vermindern. (22–24) Bis zu dem Zeitpunkt der Diagnose haben die Patientinnen und Patienten oft einen langen Weg von bis zu zehn Jahren mit oft mehreren Ärztinnen und Ärzten aus verschiedenen Teildisziplinen hinter sich. (37,38)

Als histologische Initialerscheinung gelten Hyperkeratose und Perifollikulitis der Talgdrüseneinheit des Haarfollikels, die anschließend zu follikulären Okklusion sowie Inflammation und Ruptur des Haarfollikels führen. (39–41) Extrazelluläre Matrix-abbauende Enzyme, die Matrix-Metalloproteasen, sind vermutlich an der Ausdünnung der Basalmembran der Haarfollikeleinheit beteiligt, was die Instabilität des Haarfollikels erhöht. Auf die Ruptur erfolgt eine verstärkte Entzündungsreaktion aufgrund der Freisetzung von Keratinfasern, *pathogen-associated molecular pattern*, Bakterien sowie Talgdrüseninhalt. (42) *Pathogen-associated molecular pattern* und Bakterienbestandteile aktivieren die *pattern recognition* Rezeptoren auf Makrophagen und dendritischen Zellen. Zu diesen zählen u. a. das NLRP3-Inflammasom und der *Toll-like* Rezeptor 2 (TLR2). (43–47) Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt zur Aktivierung der pro-Caspase 1, welche in ihrer aktiven Form proinflammatorische Prozesse vermittelt und so maßgeblich zur Produktion von Interleukin-1 β (IL-1 β) in der *Hidradenitis suppurativa* beiträgt. (43–45) Der in *Hidradenitis suppurativa* hauptsächlich von Makrophagen und dendritischen Zellen des dermalen Bereiches exprimierte TLR2 (46), führt nach seiner Aktivierung zur Induktion einer nachgeschalteten Signalkaskade. Diese aktiviert die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor* `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells (NF κ B) und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), was die Transkription von Genen proinflammatorischer Zytokine bewirkt (48–50) und somit die Pathogenese der *Hidradenitis suppurativa* fördert. Durch den von Makrophagen produzierten Lipidmediator Leukotrien B4 wandern neutrophile Granulozyten in den Bereich ein und werden aktiviert. (51) Zusätzlich zur entstandenen Entzündung, besiedeln die Stammzellen des rupturierten Haarfollikels die galertartigen proliferativen Substanz in den Läsionen der Dermis. In Folge dessen bilden sich epithelisierte Sinustrakte und Fistelgänge. (42) Durch die

anhaltende Entzündung kommt es zur Störung der Hautarchitektur, zur wiederholten Abszessbildung, Wunden und zur fibrotischen Narbenbildung. (52)

Das inflammatorische Infiltrat der *Hidradenitis suppurativa* Läsionen besteht neben Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten (45,46), noch aus natürlichen Killerzellen, B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) bzw. Plasmazellen. (41,46,53–55) Neutrophile Granulozyten phagozytieren Bakterien, produzieren proinflammatorische Zytokine und können durch Degranulation antimikrobielle und zytotoxische Moleküle freisetzen. Für *Hidradenitis suppurativa* wurde ferner berichtet, dass die Neutrophilen sogenannte *neutrophil extracellular traps* bilden, welche auch in anderen autoinflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses oder der rheumatoider Arthritis beobachtet werden. (55) Die *neutrophil extracellular traps* sind netzartige Strukturen, die sich primär aus der DNA neutrophiler Granulozyten sowie granulären und zytosolischen Proteinen zusammensetzen. So sind sie in der Lage pathogene Mikroorganismen zu binden und abzutöten. (55,56) Im Kontext der *Hidradenitis suppurativa* wird die Bildung dieser *neutrophil extracellular traps* mit dem Schweregrad, einem Fortschreiten der Erkrankung sowie der Präsenz von Autoantikörpern assoziiert. (55) T-Lymphozyten differenzieren im Thymus aus und verlassen diesen anschließend über die Lymph- und Blutgefäße. (57–59) Um ihre Funktionen ausüben zu können, exprimieren sie verschiedene Oberflächenmoleküle wie den T-Zell-Rezeptor und das Oberflächenmolekül CD3, welches als Marker für T-Zellen fungiert. (60) Darüber hinaus weisen sie je nach Differenzierung das Oberflächenmolekül CD4 oder CD8 auf. (57–59) CD8-T-Lymphozyten werden auch als zytotoxische T-Zelle bezeichnet, da sie infizierte und maligne Zellen sofort abtöten. Dagegen werden CD4-T-Zellen auch T-Helfer-Zellen genannt. (57) Die Präsentation von pathogenen Strukturen durch Antigen-Präsentierenden-Zellen wie Dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen aktiviert die naiven CD4-T-Zellen. Dies führt zur Differenzierung zu den entsprechenden T-Effektorzellen und deren Proliferation und damit zur Eliminierung des Pathogens. In Abhängigkeit der vorherrschenden Zytokine am Ort der Infektion differenzieren und spezialisieren sich die CD4-T-Zellen, was zu einer Pathogen-angepassten Antwort führt (Tabelle 1). (57,61)

Tabelle 1: Funktionen der CD4-T-Zellen (mod. nach Sabat *et al.* 2019 sowie Zhu und Zhu 2020)

CD4-T-Helfer-Zell-Subpopulation	Zytokine	Funktion
Typ 1 T-Helfer-Zelle	Interferon- γ	Abtötung von virusinfizierten Zellen und intrazellulären Pathogenen
Typ 2 T-Helfer-Zelle	Interleukin-4, Interleukin-5 und Interleukin-13	Botenstoffe der extrazellulären Parasitenabwehr, vermittelt den B-Zell-Klassenwechsel
Typ 17 T-Helfer-Zelle	Interleukin-17A und Interleukin-17F	Induziert antimikrobielle Abwehr am Epithel für die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen
Typ 22 T-Helfer-Zelle	Interleukin-22	Wundheilung, Gewebeschutz
Regulatorische T-Zelle	Interleukin-10 und <i>Transforming Growth Factor β</i>	Unterdrückung von Autoimmunität, vermittelt Toleranz

Untersuchungen im Rahmen der Grundlagenforschung zur *Hidradenitis suppurativa* zeigten bereits, dass das Immunzellinfiltrat in den Bereichen nahe der Epidermis u. a. CD4-T-Zellen aufweist. (41,43,62,63) Dagegen zeigten Regionen in gesunder Haut keine CD4(+)-T-Zellen. (62,63) Die genaue Zuordnung der T-Zell-Subpopulation ist in der *Hidradenitis suppurativa* jedoch aufgrund der noch unzureichend aufgeklärten Pathogenese nicht möglich. Bisher geht man aufgrund der Zytokine, die in *Hidradenitis suppurativa* Läsionen erhöht reguliert sind sowie Zytokinsekretion von T-Zellen in *Hidradenitis suppurativa*, davon aus, dass die *Hidradenitis suppurativa* eine Typ 1- und Typ 17 T-Helfer-Zell-gesteuerte inflammatorische Hauterkrankung sein könnte. Die regulatorischen T-Zellen scheinen trotz hoher IL-10 Level in *Hidradenitis suppurativa* eher vermindert vorzukommen. (43,62,64–66) Während die Funktion der neutrophilen Granulozyten und CD4-T-Zellen in der Pathogenese der *Hidradenitis suppurativa* zunehmend aufgeklärt wird, bleibt die Rolle der natürlichen Killerzellen, B-Zellen sowie Plasmazellen vorerst ungewiss. Im Zusammenhang mit den B-Zellen zeigten Untersuchungen, dass diese vermehrt in der chronischen Phase der *Hidradenitis suppurativa* auftreten. (53,67) Vermutlich tragen sie hier zur Antikörperproduktion sowie Komplementsystem-Aktivierung bei. (55,67)

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-23, Interferon- γ , TNF- α und das entzündungshemmende IL-10 eine große Bedeutung bei der abnormen Immunantwort der *Hidradenitis suppurativa* haben. (43,44,62,68–71) Eine Untersuchung von *ex vivo* *Hidradenitis suppurativa* Läsionen zeigte,

dass IL-1 β hauptsächlich über das NLRP-Inflammasom in Makrophagen produziert wird (44), wobei auch läSIONALE Keratinozyten IL-1 β sezernieren können. (63) Obwohl die IL-1 β Konzentrationen in *Hidradenitis suppurativa* im Vergleich zu gesunden Kontrollen und auch Psoriasis erhöht sind, bleiben die Level des natürlichen IL-1 Rezeptorantagonisten auf einem ähnlichen Niveau wie bei den gesunden Kontrollen. Die Untersuchung bestätigte weiterhin, dass Fibroblasten die höchsten IL-1 Rezeptoren Expressionslevel aufweisen und gleichzeitig eine ausgeprägte IL-1 β -Reaktion ausüben. Vermutlich induziert IL-1 β die Synthese von Matrix-Metalloproteasen in den Fibroblasten und trägt so zum Abbau der extrazellulären Matrix bei. Außerdem beeinflusst IL-1 β die Sekretion verschiedener Zytokine (z.B. IL-6) und Chemokine (z.B. IL-8), welche chemotaktisch auf neutrophilen Granulozyten wirken. (44) Interleukin-17 wird hauptsächlich von CD4(+)-T-Zellen und neutrophilen Granulozyten unter Beteiligung von IL-23 sezerniert (45,63), welches in *Hidradenitis suppurativa* von Makrophagen exprimiert wird. (62) Als Folge der IL-17 Sekretion produzieren Endothel- und Epithelzellen sowie Fibroblasten IL-6, IL-8 und den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor. (72) So ist IL-17 wahrscheinlich an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Produktion proinflammatorischer Zytokine der Keratinozyten in Läsionen der *Hidradenitis suppurativa* beteiligt. (43,55) Die hohen IL-17 Level führen auch zur Hochregulation der antimikrobiellen Peptide S100A8 und S100A9 in läSIONALER *Hidradenitis suppurativa* Epidermis (45,73), was wiederum eine proentzündliche Zytokin- und Chemokin-Expression zur Folge hat und die Proliferation von Keratinozyten fördern kann. (74) Das von Makrophagen produzierte IL-12 in der *pappilaren* und *reticularen* Dermis (62) stimuliert die Produktion von Interferon- γ (57) in CD4- sowie CD8(+)-T-Zellen, was die Hypothese zur Typ 1 T-Helfer-Zell-gesteuerte Hauterkrankung stützt. (63) Interferon- γ fungiert als Aktivator von Makrophagen. Hohe Interferon- γ Level werden zudem mit autoinflammatorischen und Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise entzündliche Darmerkrankungen und Multiple Sklerose assoziiert. (69) Als pleiotropes Zytokin beeinflusst TNF- α eine Vielzahl von Zellen im Körper. So bewirkt es in der Haut verschiedene Chemokine, trägt zur Endothelaktivierung bei und begünstigt die Gewebeeinfiltration von Immunzellen. (75,76) In der Haut von *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten wird es hauptsächlich von Makrophagen und Lymphozyten produziert. Aber auch basale Zellen der Schweißdrüsen und Haarfollikel weisen eine TNF- α Expression auf. (77) Interleukin-10 hat eine entzündungshemmende Funktion bei Infektionen sowie bei der Eindämmung von Immunreaktionen und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Prävention von Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen. Bei *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten wird IL-10 hauptsächlich von Makrophagen durch die Induktion von bakteriellen Bestandteilen oder Zytokinen wie TNF- α produziert. (70) Darüber hinaus könnte bei den aktiven Raucherinnen und Rauchern der

Hidradenitis suppurativa Patientinnen und Patienten das Nikotin dafür verantwortlich sein, dass die intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat Spiegel steigen und somit zur kutanen IL-10 Produktion beitragen. (78,79)

Im Zusammenhang mit der Pathogenese der *Hidradenitis suppurativa* wird auch die Rolle des Mikrobioms der Haut diskutiert. Kommensale Bakterien wirken als Schutz gegenüber pathogenen Bakterien. (80) In der *Hidradenitis suppurativa* werden hauptsächlich *Staphylococcus aureus* und *Coagulase-negative Staphylococci* als pathogene Bakterien beschrieben (81,82) und eine bakterielle Biofilmbildung mit dem chronischen Bild der *Hidradenitis suppurativa* assoziiert. (83) In einem Vergleich zwischen klinisch nicht-betroffener Haut bei *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten und gesunder Haut wurde bei der nicht-betroffenen Haut weniger bakterielle Besiedlung und Biofilm detektiert als bei den gesunden Kontrollen. (84) Folglich wird aktuell davon ausgegangen, dass die bakterielle Besiedlung und Biofilmbildung sich im Krankheitsverlauf manifestieren.

1.3 Behandlungsmöglichkeiten der *Hidradenitis suppurativa*

Aufgrund der noch unzureichend aufgeklärten pathophysiologischen Hintergründe, die zur Entwicklung und zum Verlauf der *Hidradenitis suppurativa* beitragen, gibt es derzeit keine kausale Therapie, sodass lediglich die Symptome behandelt werden können. Neben der Behandlung der Schmerzen wird zwischen topischer, systemischer und chirurgischer Therapie unterschieden. Die Behandlung der *Hidradenitis suppurativa* sollte aufgrund des Schweregrades nach Hurley erfolgen und dabei auch die subjektiven Auswirkungen auf Patientinnen und Patienten berücksichtigen. Eine medikamentöse Therapie kann entweder als Monotherapie oder begleitend zu einer operativen Maßnahme erfolgen. (18,85)

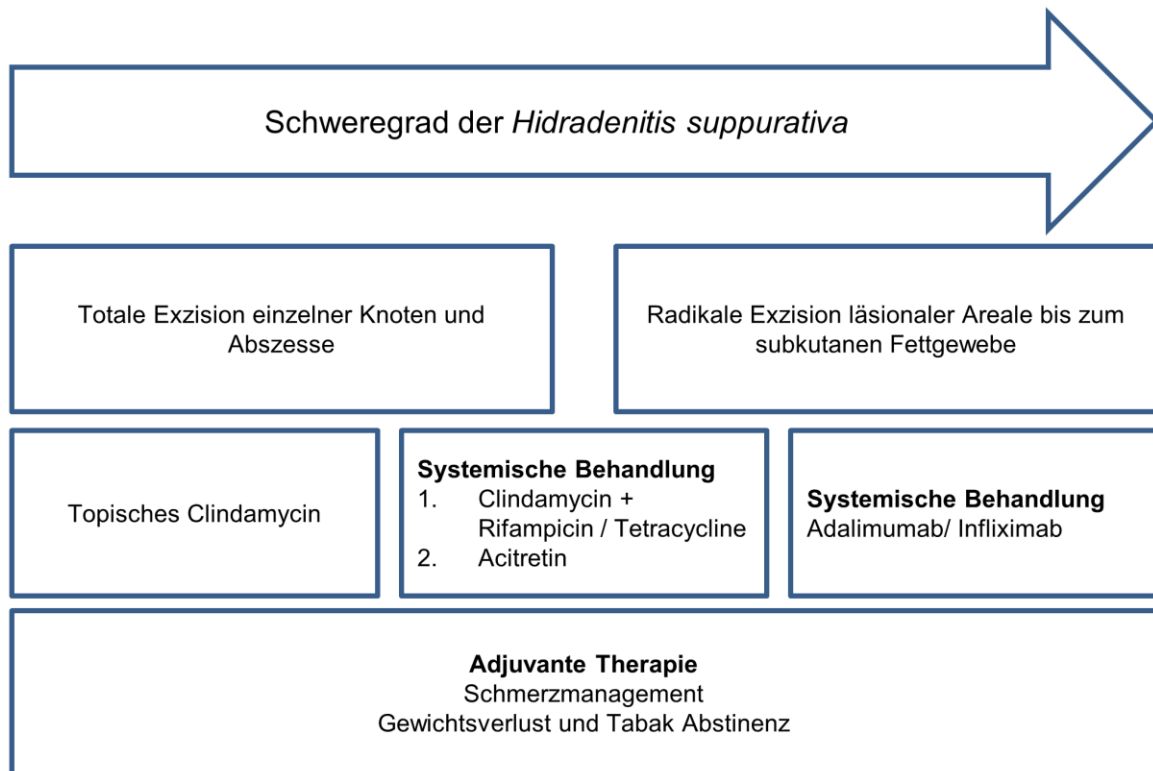


Abbildung 5: Behandlungsalgorithmus zur Behandlung der *Hidradenitis suppurativa* nach der Europäischen S1 Leitlinie.

Begleitend zur medikamentösen Therapie sollen die Schmerzen behandelt und die Patientinnen und Patienten ggf. auf die positive Wirkung von Gewichtsverlust und Tabak Abstinenz auf den Therapieerfolg hingewiesen werden. Bei einer milden *Hidradenitis suppurativa* soll topisches Clindamycin empfohlen werden, bei einer moderaten bis schweren *Hidradenitis suppurativa* ist die systemische Behandlung mit Clindamycin und Rifampicin die Therapie der ersten Wahl. Wenn die Therapie unzureichend ist, kann systemisch Adalimumab oder Infiximab eingeleitet werden. In der operativen Versorgung sollten einzelne Knoten und Abszesse komplett exzidiert werden, großflächigere läSIONALE Areale sollten radikal bis hin zum subkutanen Fettgewebe entnommen werden. (modifiziert nach Zouboulis *et al.* 2015)

Als topische Therapie wird beispielsweise 1 %-ige Clindamycin Lösung bei Hurley I und mildem Hurley II empfohlen (Abbildung 5). Zusätzlich kann die Clindamycin Lösung begleitend bei schwereren Verläufen verschrieben werden. Clindamycin stört die Proteinsynthese der Bakterien durch die Bindung an die 50s Untereinheit an Ribosomen. (18,85) Neben der bakteriostatischen Wirkung deuten *in vitro* Daten auch auf Einflüsse bezüglich Makrophagenfunktion und Neutrophilen Antwort auf Chemokine hin. (86,87)

In der systemischen Behandlung werden u. a. orale Antibiotika, Kortikosteroide, Retinoide und Biologika eingesetzt. (18,85) Zu den hier empfohlenen Antibiotika gehören Tetracycline, die an die 30s ribosomale Untereinheit der Bakterien binden und so die Proteinsynthese stoppen. (85) Darüber hinaus bestehen Hinweise zu möglichen immunmodulierenden Wirkungen der Tetracycline durch die Reduktion von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α . (88) Die

Kombination aus Clindamycin und Rifampicin wird als Systemtherapie der ersten Wahl empfohlen. (18,85) Der Wirkmechanismus liegt in der verminderten bakteriellen Kolonisation der Haarfollikel (18) durch die bakteriostatische Wirkung von Clindamycin und die bakterizide Wirkung von Rifampicin (18,85), sowie der Verringerung proinflammatorischer Prozesse. (18) Rifampicin konnten bereits mehrere immunmodulatorische Effekte mittels *in vitro* und *in vivo* Modellen nachgewiesen werden (89–97), für die *Hidradenitis suppurativa* wurde diese Wirkung jedoch noch nicht genauer untersucht. Zur antiinflammatorischen immunsuppressiven Therapie mit Kortikosteroiden und Cyclosporin-A liegen nur limitiert Daten vor, eine Therapie kann jedoch erwogen werden. Als Retinoid kann eine Therapie mit Acitretin in Betracht gezogen werden. (18,85) Für die moderate bis schwere Form der *Hidradenitis suppurativa* (Hurley II und III) kann der zugelassene TNF- α Inhibitor Adalimumab verordnet werden. Darüber hinaus wird Infliximab, ein weiterer TNF- α Inhibitor, für die Therapie der moderaten bis schweren Form empfohlen.

Unter der chirurgischen Therapie wird die vollständige Exzision des läsionalen Gewebes verstanden. Dabei sollten bei Hurley I bis II einzelne Knoten und Abszesse partiell exzidiert werden. Eine radikale Exzision der läsionalen Areale, teils bis ins subkutane Fettgewebe, wird dagegen bei Hurley II und III empfohlen. (18,85)

1.4 Rifampicin in der Therapie der *Hidradenitis suppurativa*

Auch wenn die Mehrheit der *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten vom Schweregrad Hurley I und II betroffen sind (98), werden die meisten Medikamente für die Behandlung der Erkrankung im Hurley Stadium II und III empfohlen. (18,85) Auf diese Arzneimittel sprechen die Betroffenen gut an und zeigen deutliche Verbesserungen bezüglich des Hautbildes, Schmerzen und Lebensqualität. (99–103) Jedoch kann die Einnahme dieser Medikamente auch mit einer Reihe von Nebenwirkungen wie Leberschädigung, akutes Nierenversagen, gastrointestinale Beschwerden, bakterielle Resistenzen oder erhöhtes Infektionsrisiko einhergehen (102–105), was eine Therapie in den leichteren Formen der *Hidradenitis suppurativa* nicht rechtfertigen würde. Um den in den schwereren Formen entstehenden Hautdestruktionen vorzubeugen, müssten effiziente Medikamente allerdings möglichst früh eingesetzt werden. (18) Das in der systemischen *Hidradenitis suppurativa* Behandlung sehr effizient wirkende Rifampicin könnte hier in

anderer Applikationsform zum Einsatz kommen. Rifampicin ist ein semisynthetisches Derivat des Rifamycin B, ein antimikrobieller Wirkstoff, welcher vom *Streptomyces mediterranei* produziert wird (Abbildung 6). (106)

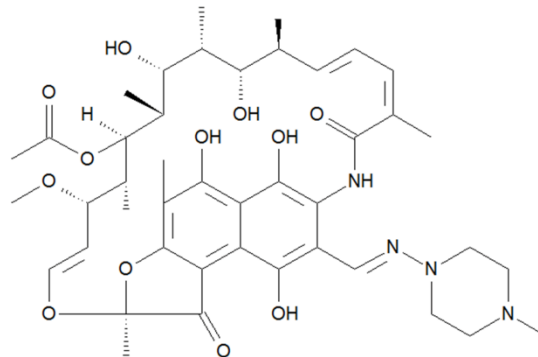


Abbildung 6: Strukturformel von Rifampicin. Erstellt mit Chemograph.

Sein Wirkungsmechanismus besteht in der Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von Bakterien (107,108) und inhibiert so das Wachstum von sowohl Gram-positiven Bakterien als auch einigen Gram-negativen Bakterien sowie *Staphylococcus aureus*, *Coagulase-negative Staphylococci* (109) und Mycobakterien. (110) Aufgrund seiner bakteriziden Wirkung gegen Mykobakterien wird es zur Behandlung der Tuberkulose angewendet. (111–113) Aber auch bei Infektionen mit nichttuberkulösen Mykobakterien wird es in Kombination mit anderen antimykobakteriell wirksamen Antiinfektiva eingesetzt (114–116) sowie bei Infektionen mit dem *Mycobacterium leprae*. (117,118) Des Weiteren findet Rifampicin als Prophylaxe-Behandlung bei der Meningokokken-Meningitis Anwendung. (119,120) In Zusammenhang mit der immunmodulatorischen Wirkung konnte bereits ein inhibitorischer Effekt auf die Lipopolysaccharid-induzierte IL-1 β und TNF- α Sekretion in verschiedenen Zelllinien von mononuklearen Zellen, BV-2 Mikrogliazellen, RAW 264.7 Makrophagen sowie primären Mikrogliazellen und Makrophagen nachgewiesen werden. (89–91) Außerdem reduzierte die Behandlung mit Rifampicin u. a. die IL-6 und IL-10 Level in einem *in vitro* Model für Parkinson und einem murinen *in vivo* Model für den endotoxischen Schock. (96,97) Bei *in vitro* Modellen von neurodegenerativen Erkrankungen, Immunregulatorischen Modellen sowie in einem Tiermodell zur Multiplen Sklerose konnte gezeigt werden, dass Rifampicin die TLR2 Expression hemmt. (91–95)

Nach oraler Einnahme auf leeren Magen wird Rifampicin nahezu vollständig aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die Einzelgabe von 600 mg Rifampicin führt nach ca. 2 h zu einer Serumkonzentration von ca. 20 $\mu\text{g/mL}$, bei dieser Gabe beträgt die Halbwertszeit 2,5 h. Das resorbierte Rifampicin wird zu 80 % an Plasmaproteine, wie Albumin, gebunden transportiert. Im menschlichen Körper verteilt sich Rifampicin gut in den verschiedenen

Gewebe, wenn auch im unterschiedlichen Ausmaß. Nach der Metabolisierung in der Leber zu seinem Hauptabbaumetaboliten Desacetyl Rifampicin, wird es über die Galle und den Urin ausgeschieden. (121,122) Durch seine rotorangene Farbe (106), verfärbt es nach Einnahme Körperflüssigkeiten wie Tränen, Urin und Schweiß entsprechend. (123) Da Rifampicin ein starker Induktor mikrosomaler Leberenzyme ist, induziert es seinen eigenen Stoffwechsel und den anderer Medikamente, weshalb es hier zu pharmakokinetischen Interaktionen kommen kann. (121,122) Den größten Effekt auf die Expression hat Rifampicin auf das Zytochrom P450 3A4 in der Leber und im Dünndarm. (124–126) Das Zytochrom P450 3A4 ist essentiell für die Biotransformation und damit den Metabolismus von mehr als 60 % der Arzneimittel. Durch die Bindung von Rifampicin an den Pregnan X Rezeptor bildet dieser einen Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor, welcher dann am DNA *response element* bindet, so die Zytochrom P450 3A4 dNA-Transkription steigert und damit die Zytochrom P450 3A4 Proteinsynthese. (127) Zu den Arzneimitteln, deren Metabolismus somit durch die gleichzeitige Einnahme von Rifampicin beeinflusst werden, gehören u. a. Analgetika, Antidepressiva, Medikamente für die Diabetes Mellitus Therapie, Blutdruck- und Lipidsenker sowie Glucocortikoide und hormonelle Kontrazeptiva. (128–151)

1.5 Forschung in der *Hidradenitis suppurativa*

In der Forschung zur *Hidradenitis suppurativa* werden verschiedene Methoden eingesetzt, um prädisponierende Faktoren und pathophysiologische Vorgänge aufzuklären oder die Wirkung von Medikamenten für die Behandlung der *Hidradenitis suppurativa* zu untersuchen. Hierzu zählen Daten aus Fragebögen, klinischen Studien, wissenschaftlichen Untersuchungen sowie *in vitro* und *ex vivo* Experimenten. (42–44,46,53,62,70,71,75,100,152–156)

So konnte die Beteiligung verschiedener Hautzellen, Immunzellen und Zytokine am Entzündungsprozess der *Hidradenitis suppurativa* belegt werden. (43,46,53,62) In den *in vitro* Untersuchungen, der klassischen Monolayer Zellkultur, werden meistens primäre Zellen aus dem Blut oder der Haut von *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten verwendet (Abbildung 7), welche aus Biopsien oder dem exzidierten läsionalen Gewebe im Rahmen der operativen Therapie gewonnen werden. Aufgrund der Epidemiologie der *Hidradenitis suppurativa* handelt es sich bei diesen Zellen um adulte Zellen. Damit muss während der Arbeit mit diesen Zellen beachtet werden, dass diese im Vergleich zu juvenilen

Zellen oder Zelllinien weniger proliferieren. (157) Außerdem werden Zelllinien oder gesunde primäre Zellen mit verschiedenen Zytokinen stimuliert, die mit der Pathophysiologie der *Hidradenitis suppurativa* assoziiert werden, um so ein inflammatorisches Modell zu generieren. (44,51,71,152,153) Zu den hierzu verwendeten Zytokinen zählen u. a. IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-19, IL-22, TNF- α und Interferon- γ . Als Methode stellt die klassische Monolayer Zellkultur eine wichtige Rolle bei der Aufklärung molekularer Signalwege, zelluläre Morphologie oder der Entwicklung von Arzneimitteln dar. Anhand solcher Modelle konnte nachgewiesen werden, dass IL-1 β maßgeblich am Entzündungsprozess der *Hidradenitis suppurativa* beteiligt ist, indem es die Expression der Matrix-Metalloproteasen in den Fibroblasten induziert. (44)

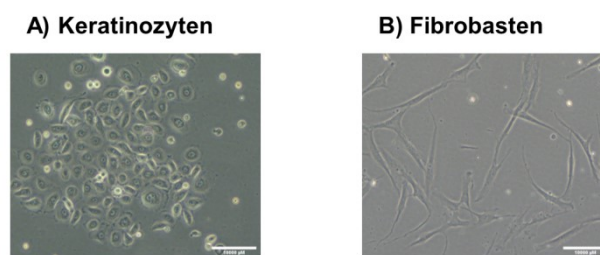


Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen von isolierten Keratinozyten und Fibroblasten aus läsionalen *Hidradenitis suppurativa* Gewebe.

Primäre A) Keratinozyten und B) Fibroblasten wurden nach der Isolation aus läsionalen *Hidradenitis suppurativa* Gewebe in Zellkulturflaschen gesät. Gezeigt werden Aufnahmen von primären Zellen elf Tage nach der Einsaat, die mit dem Olympus CKX41 Mikroskop in 20x Vergrößerung aufgenommen wurden.

Für die *ex vivo* Forschung werden humane Hautbiopsien, sogenannte Explantate, aus der Haut entnommen und anschließend *ex vivo* kultiviert. Dazu werden sie in ein *transwell* System überführt, bei dem die Epidermis nach oben zeigt. Mit dem Wechsel des Kulturmediums können die Explantate mehrere Tage kultiviert und je nach Fragestellung behandelt und untersucht werden (Abbildung 9). Diese *ex vivo* Explantate bieten ein ideales Konzept für die Grundlagenforschung sowie Arzneimittel- und Biomarker-Screening im Labor, da sie alle Merkmale des ursprünglichen Gewebes aufweisen. (44,75,154,158–164) Die Praktikabilität dieser Modelle für die Testung topischer Therapeutika wurde bereits in gesunder Haut getestet, demnach eignen sich die *ex vivo* Explantate sehr gut für die Testung topischer Formulierungen, was den Bedarf von Tiermodellen präklinischen Untersuchungen ersetzen könnte. (160) Im Rahmen der *Hidradenitis suppurativa* Forschung nutzt man diese *ex vivo* Modelle, da bisher keine geeigneten Modelle existieren, die das Bild der entzündlichen Erkrankung umfänglich genug abbilden. Eine Behandlung der Biopsien mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern führte beispielsweise zu einer reduzierten mRNA- und Proteinexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 oder TNF- α . Dieser Effekt spiegelte auch die klinische Erfahrung der Autoren wider. (75) Aber auch in der

Grundlagenforschung findet dieses Modell Anwendung. (70,154) So zeigte eine Gruppe bereits vor 10 Jahren, dass läsionale im Vergleich zu periläsionaler bzw. gesunder Explantate mehr TNF- α , IL-1 β sowie IL-10 sezernieren, was somit eine Begründung liefert, *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten gezielt mit Biologika zu behandeln. (70)

Auch wenn es bislang keine *in vivo* Modelle gibt, welche das klinische Bild der *Hidradenitis suppurativa* umfassend genug wiedergeben, wurden etablierte Tiermodelle für andere Krankheiten wie Akne-ähnliche Erkrankungen auch für die Eignung als Tiermodell der *Hidradenitis suppurativa* diskutiert. Zu diesen Modellen gehören *Hidradenitis suppurativa* beim Hund, Pyodermie beim Deutschen Schäferhund, γ -Sekretase-*Knockout*-Mäuse sowie Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-vermittelte Chlorakne. (165) Erst kürzlich wurde ein *Hidradenitis suppurativa* Xenotransplantations Mausmodell etabliert. Dafür wurden immundefiziente *NOD-scif-gamma*-Mäuse verwendet, die humanes IL-3, Granulozyten- und Makrophagen-Koloniebildenden Faktoren sowie Stammzellfaktoren exprimieren, und transplantierten läsionales *Hidradenitis suppurativa* Gewebe in diese Mäuse. (166) Ein weiteres Modell präsentierte wichtige phänotypische Merkmale der *Hidradenitis suppurativa*, wie Hyperkeratose, Entzündung des Haarfolikels sowie die erhöhte Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-23. Die Autoren entwickelten dafür eine Keratin 5-Cre-gesteuerte Epidermisspezifische Nicastrin-*Knockout*-Mutante in Mäusen. (30) Jedoch zeigten beide Modelle im Verlauf der Validierung Defizite auf, sodass weitere Modifikationen an den Modellen für die Nutzung in der Forschung nötig wären.

Ein Zellkulturmodell, das bereits bei anderen entzündlichen Hautkrankheiten wie der atopischer Dermatitis und Psoriasis Anwendung fand, sind rekonstruierte humane Hautäquivalente. Je nach Fragestellung werden dafür rekonstruierte humane Vollhautmodelle, welche die dermalen und epidermalen Schichten aufweisen, oder reine Epidermismodelle genutzt. (167–170) Für die *Hidradenitis suppurativa* gab es bisher keine Versuche ein Epidermismodell oder gar Vollhautmodell *in vitro* zu kultivieren, obwohl diese eine gute Möglichkeit bieten *in vivo*-nahe Grundlagenforschung zu betreiben und erste Erkenntnisse zu neuen Therapieoptionen durch eine Behandlung der Modelle zu gewinnen. Auch wenn die Entzündung der *Hidradenitis suppurativa* aus der Tiefe der Haut kommt, stellen Epidermismodelle eine wichtige Option in der Forschung dar. Zum einen wurde die Bedeutung der Keratinozyten während der Entzündung der *Hidradenitis suppurativa* erst kürzlich von Schell *et al.* 2023 erneut bestätigt. (171) Besonders für Untersuchungen der Barrierefunktion der *Hidradenitis suppurativa*, eignen sich Epidermismodelle hervorragend. Störungen der Barrierefunktion ähnlich der Psoriasis wurden bereits beobachtet. (172) Zum anderen ist die Epidermis der entscheidende Faktor bei der Entwicklung eines Hautmodells,

besonders im Hinblick auf die Verwendung von primären Zellen und eine spätere Entwicklung eines Vollhautmodells. So sind Epidermismodelle etwas einfacher und deutlich günstiger herzustellen als die rekonstruierten Vollhautäquivalente. Sie bestehen meist aus primären Keratinozyten bestehen, die auf eine semipermeable Membran gebracht und zunächst submers kultiviert werden. Anschließend werden diese Modelle an die Luftflüssigkeitsphasengrenze gehoben, um die terminale Differenzierung der Keratinozyten zu induzieren (Abbildung 8). Die *ex vivo* Explantate stellen derzeit das beste Modell für die Forschung an der *Hidradenitis suppurativa* dar, jedoch hat auch dieses Modell seine Grenzen. Die Operationen finden nicht regelmäßig statt und die Explantate müssen direkt in Kultur genommen werden. Im Unterschied dazu können Experimente durch die Gewinnung von primären Zellen aus dem Gewebe für die Rekonstruktion von Epidermismodellen flexibler in den Forschungsalltag integriert werden. Die Epidermismodelle können kultiviert werden, ohne dass zusätzliche Biopsien notwendig sind, da großflächige Exzisionen von *Hidradenitis suppurativa*-betroffenen Arealen eine Säule der Therapie bei schwer betroffenen Patientinnen und Patienten darstellt. Von dem exzidierten Gewebe werden Proben für histologische Untersuchungen genommen, der Rest des Gewebes wird in der Regel als Operationsabfall entsorgt. So kann primäres Material für die Herstellung solcher *in vitro* rekonstruierten Hautäquivalente gewonnen werden. Für die Induktion der entzündlichen Umgebung der Modelle können diese gemeinsam mit *Hidradenitis suppurativa*-assoziierten Zytokinen kultiviert werden, so wie es auch bei der Kultivierung von Hautmodellen der atopischen Dermatitis und Psoriasis gehandhabt wird. (158,167–170,173) Darüber hinaus weisen Epidermismodelle weitere Vorzüge wie beispielsweise die genetische Manipulation auf und können ebenfalls als Ersatz von Tiermodellen dienen. (174,175)

1.6 Zielsetzung

Die *Hidradenitis suppurativa* ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, deren Ätiologie und Pathophysiologie noch nicht vollständig geklärt sind. (19) Gemäß der Einteilung nach Hurley, gibt es drei Schweregrade der *Hidradenitis suppurativa*. (25) Von der milden bis mittelschweren Form der *Hidradenitis suppurativa* (Hurley I und Hurley II) sind ungefähr 80 % der Patientinnen und Patienten betroffen. (98) Dennoch empfehlen die Leitlinien die meisten Medikamente für die Behandlung von Hurley Stadium II oder III. (18,85) Diese medikamentösen Therapien sind hochwirksam (99–103), jedoch wäre eine Behandlung der

milden und mittelschweren *Hidradenitis suppurativa* aufgrund ihrer systemischen Wirkung, und damit einhergehenden Nebenwirkungen, unverhältnismäßig. Zudem stellen die Arzneimittel für Hurley II und III nur akute Therapien dar, die aber nicht etwaige Hautdestruktionen wie Narbenstränge rückgängig machen können. (176)

Daher soll in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Technologie der Goethe Universität Frankfurt eine Rifampicin-Nanoformulierung zur Behandlung milder bis mittelschwerer *Hidradenitis suppurativa* entwickelt und im Labor der dermatologischen Klinik präklinisch validiert werden. Da für die *Hidradenitis suppurativa* bislang kein valides Tiermodell entwickelt wurde (30,166,177,178), sollen im Rahmen dieser Dissertation zunächst verschiedene Zellkulturmodelle von betroffenen Patientinnen und Patienten etabliert werden. Aus exzidiertem Gewebe sollen dazu primäre epidermale und dermale Zellen isoliert werden, um diese schließlich für Monolayer Zellkulturversuche sowie zur Herstellung von Epidermismodellen zu nutzen. Als weiteres Modell sollen *ex vivo* Explantate etabliert werden. Diese wurden bereits für verschiedene Fragestellungen in der Grundlagenforschung angewendet und gelten derzeit als zuverlässigstes System für die Untersuchung mechanistischer Abläufe in der *Hidradenitis suppurativa*. (162,177) Anhand dieser Zellkulturmodelle soll die vom Institut für Pharmazeutische Technologie entwickelte Rifampicin-Nanoformulierung präklinisch mittels Zytotoxizitätstests sowie immunhistologischen Färbungen zur Proliferation und Differenzierung der Zellen validiert werden. Gleichzeitig soll die immunmodulierende Wirkung von Rifampicin in *Hidradenitis suppurativa* näher charakterisiert werden. Da es sich bei der *Hidradenitis suppurativa* primär nicht um eine Infektionskrankheit handelt, sondern vielmehr um eine u. a. Bakterien getriggerte, chronisch autoentzündliche Erkrankung (19,52,83), lässt sich der positive Effekt einer systemischen Rifampicinbehandlung wahrscheinlich eher auf eine antiphlogistische Wirkweise zurückführen, als auf die bakterizide Inhibition der DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Hierfür spricht außerdem, dass bereits in mehreren Publikationen gezeigt wurde, dass Rifampicin die Sekretion von IL-1 β und TNF- α in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen inhibiert. (89–91,96,97) Mit Hilfe der hier etablierten Zellkulturmodelle soll deshalb die immunmodulierende Wirkung von Rifampicin auf *Hidradenitis suppurativa*-typische Proteine und Zellen untersucht werden, um diese Hypothese näher zu beleuchten. Außerdem soll ein Marker für die Wirksamkeit der neu entwickelten Rifampicin-Nanoformulierung gefunden werden, welche in der kurzfristigen und langfristigen antiinflammatorischen Therapie der *Hidradenitis suppurativa* Anwendung finden könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Reinheitsgrad	Bestellnummer	Hersteller
Albumin Faktor V (Bovines Serumalbumin, BSA)	≥ 98 %	1ETA.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat	≥ 98 %, p.a.	9592.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L(+)-Ascorbinsäure	Ph. Eur.	83568.180	VWR, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	-	A512.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	≥ 95 %	2387	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	≥ 95,5 %	A994.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entellan®	-	107961	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	≥ 99,8 %	K928.4	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluoromount-G	-	00-4958-02	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	-	A1123.0500	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Humanes IL-1β	≥ 98 %	200-01B	Peprotech, Winterhude, Deutschland
Humanes IL-6	≥ 98 %	200-06	Peprotech, Winterhude, Deutschland
Humanes IL-12	≥ 98 %	200-12	Peprotech, Winterhude, Deutschland
Humanes IL-17A	≥ 98 %	200-17	Peprotech, Winterhude, Deutschland
Humanes IL-22	≥ 98 %	200-22	Peprotech, Winterhude, Deutschland

Humanes IL-23	≥ 95 %	200-23	Peprotech, Winterhude, Deutschland
Humanes TNF-α	≥ 98 %	300-01A	Peprotech, Winterhude, Deutschland
Isopropanol	≥ 98 % (GC), p.a.	33539-2.5L-M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	≥ 99,9 %	HN02.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lipid Lipoid S 100	-	-	Lipiod GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Lipopolysaccharide	Zellkultur geeignet	L4391	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Puriss. p.a.	322132-2.5-M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Blotting Grade, pulv. fettarm	T145.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Ph. Eur.	10735921	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS; 20 %)	reinst.	A3942,1000	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (5 N)	-	A182159,1211	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	≥ 95 %	A3813,0500	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	≥ 99,9 %	A0999	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Rifampicin	≥ 97 %	R7382	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Roti® Histofix (4 %)	-	P087.5	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel (37,5:1)	-	3029.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure Alkohol (0,25 %/70 %)	-	14473.02500	Morphisto, Offenbach, Deutschland
Staurosporin	≥ 98 %	S4400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tetramethylethylendiamin	≥ 98,5 %, p.a.	2367.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	-	X100-5ML	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Trizma® base	≥ 99,9 %	T1503-1KG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween® 20	Ph. Eur.	9127.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	≥ 98 %	28973.363	VWR, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Zellen, Medien, Zusätze und Enzyme für die Zellkultur

Tabelle 3: Verwendete Zellen

Zellen	Ursprung
HaCaT (Zelllinie)	Humane Keratinozyten
NIH 3T3 (Zelllinie)	Murine Fibroblasten
Primäre Fibroblasten aus <i>Mamma</i>	Patientinnen- und Patientenprobe (human; Spenderin/Spender 8, 9, 11, 21)
Primäre Keratinozyten aus <i>Hidradenitis suppurativa</i>	Patientinnen- und Patientenprobe (human; Spenderin/Spender 7, 18, 20, 27, 30)
Primäre Keratinozyten aus <i>Mamma</i>	Patientinnen- und Patientenprobe (human; Spenderin/Spender 5, 13, 14)
Primäre Keratinozyten aus <i>Präputium</i>	Patientinnen- und Patientenprobe (human; Spender 1, 27, 47, 58, 90, 109, 113, 179, 189)

Tabelle 4: Fertig-Medien für die Zellkultur

Fertig-Medien	Bestellnummer	Hersteller
Cryo-SFM (Kryomedium)	C-29912	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
CNT PR (Prime Medium)	CNT-PR	CellnTEC, Bern, Schweiz
CNT PR 3D (3D Medium)	CNT-PR-3D	CellnTEC, Bern, Schweiz
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> GlutaMAX™, + 4,5 g/L D-Glukose, - Pyruvat	61965-026	Gibco, Darmstadt, Deutschland
<i>Iscover's Modified Dulbecco's Medium</i> , + L- Glutamine, + 25 mM HEPES	12440-053	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Keratinocyte Growth Medium 2 (Keratinozyten Medium)	C-20011	PromoCell, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 5: Zusätze und Enzyme für die Zellkultur

Zusätze/Enzyme	Bestellnummer	Hersteller
Calciumchlorid Solution	C-34005	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Defined Trypsin Inhibitor	R007100	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's PBS, -CaCl ₂ , -MgCl ₂ (DPBS ⁻)	14190-094	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's PBS, +CaCl ₂ , +MgCl ₂ (DPBS ⁺⁺)	D8662-500ML	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fötales Kälberserum superior	S06150298G	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hepespuffer (1 M)	15630-056	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Humanes Serum, Type AB	C15-021	GE Healthcare, Life Science, Little Chalfont, UK
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	11140-035	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin, + 10.000 Units/mL Penicillin, + 10.000 Units/mL Streptomycin	15140-122	Gibco, Darmstadt, Deutschland
SupplementMix Keratinocyte Growth Medium 2	C-39016	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Thermolysin (50-100 Units/mg Protein (E1%/280))	T7902	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin (2,5 %)	15090-046	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,04 %/0,03 %)	C-41020	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Trypsin Neutralizing Solution	C-41120	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Ultra Pure™ 0,5 M EDTA, pH 8,0	15575-020	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 6: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
<i>Ex vivo</i> Explantat-Medium	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> 0,5 % humanes Serum, Typ AB
Fibroblasten Medium	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> 10 % Fötales Kälberserum
HaCaT Medium	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> 10 % Fötales Kälberserum 1 % Penicillin-Streptomycin
Keratinocyten Medium	Keratinocyte Growth Medium 2 Calciumchlorid Solution SupplementMix
NIH 3T3 Medium	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> 10 % Fötales Kälberserum 1 % Penicillin-Streptomycin 1 % MEM- Non Essencial Amino Acid

2.1.3 Reagenzien/Größenstandards/verwendete Kits

Tabelle 7: Reagenzien, Größenstandards und verwendete Kits

Reagenz/Größenstandard/verwendete Kits	Bestellnummer	Hersteller
Albumin Faktor V (Bovines Serumalbumin, BSA)	1ETA.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bradford-Reagenz Quick Start™ Bradford	5000205	BioRad, München, Deutschland
4,6-Diamidin-2'-phenylindol (DAPI)	R37606	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	DY008	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
HIER Citrat Buffer pH 6.0 (10x)	ZUC028-500	Zytomed, Bargteheide, Deutschland
Human IL-1 β Flex Set (Bead B4)	558279	BD, Heidelberg, Deutschland
Human IL-1/IL-1F2 DuoSet ELISA	DY201	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Human IL-2 Flex Set (Bead A4)	558270	BD, Heidelberg, Deutschland
Human IL-4 Flex Set (Bead A5)	558272	BD, Heidelberg, Deutschland
Human IL-6 Flex Set (Bead A7)	558276	BD, Heidelberg, Deutschland
Human IL-8 Flex Set (Bead A9)	558277	BD, Heidelberg, Deutschland
Human IL-10 Flex Set (Bead B7)	558274	BD, Heidelberg, Deutschland
Human IL-12/IL23p40 Flex Set (Bead E5)	560154	BD, Heidelberg, Deutschland
Human IL-13 Flex Set (Bead E6)	558450	BD, Heidelberg, Deutschland
Human IL-17A Flex Set (Bead B5)	560383	BD, Heidelberg, Deutschland
Human IL-17F Flex Set (Bead C6)	562151	BD, Heidelberg, Deutschland
Human Soluble Protein Master Buffer Kit (for Cytometric Bead Assay)	558264	BD, Heidelberg, Deutschland
Human TNF Flex Set (Bead C4)	560112	BD, Heidelberg, Deutschland
Human TNF-alpha DuoSet ELISA	DY210	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Clarity Western ECL Substrat	1705061	BioRad, München, Deutschland
Epredia™ Shandon™ Eosin-Y Stain	6766007	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Hämatoxylin	105174	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayer's Hämatoxylin	254766.1610	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Molekulargewichtsmarker für Proteine	26620	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Permanent AP Red Kit	ZUC001-125	Zytomed, Bargteheide, Deutschland
RIPA Buffer (10x)	9806	CellSignaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland
HIER T-EDTA Buffer pH 9.0 (10x)	ZUC029-500	Zytomed, Bargteheide, Deutschland
Tris/Glycine/SDS (Lämmli-Laufpuffer; 10x)	1610772	BioRad, München, Deutschland
Tris-Wash Buffer B (20x)	ZUC066-500	Zytomed, Bargteheide, Deutschland
WST-1	11644807001	Roche, Mannheim, Deutschland
Zytotoxizität Detektions Kit	11644793001	Roche, Mannheim, Deutschland

2.1.4 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für die Zellkultur

EDTA (2 %)	5 mL EDTA (Ultra Pure™ 0,5 M EDTA, pH 8,0) ad 500 mL PBS ⁻
EDTA (0,2 %)	50 mL EDTA (2 %) ad 500 mL PBS ⁻
Hepespuffer (0,01 %)	2 mL Hepespuffer (1 M) ad 200 mL destilliertes Wasser
Wasch-Lösung (1 %)	5 mL Penicillin-Streptomycin ad 500 mL PBS ⁺⁺
Thermolysin	100 mg Thermolysin 500 mg Kaliumchlorid 580 mg Natriumchlorid 147 mg Calciumchlorid 200 mL 0,01 M Hepespuffer anschließend steril-Filtrieren
Trypsin/EDTA-Lösung	50 mL Trypsin (2,5 %) 50 mL EDTA (2 %) 900 mL PBS ⁻

Puffer und Lösungen für die Protein-Analyse

BSA-Lösung (5 %)	5 g BSA ad 100 mL TBST
Milchpulverlösung (5 %)	5 g Milchpulver ad 100 mL TBST
SDS-Denaturierungs- und Ladepuffer	370 mg DTT 4 mL SDS 303 mg Trizma® base 4 mL Glycerin 40 mg Bromphenolblau ad 10 mL destilliertes Wasser
SDS-PAGE-Laufpuffer (1x)	200 mL Lämmli-Laufpuffer (10x) ad 2 L destilliertes Wasser
SDS-Sammelgelpuffer	12,1 g Trizma® base 4 mL SDS ad 200 mL destilliertes Wasser
SDS-Trenngelpuffer	72,7 g Trizma® base 8 mL SDS ad 400 mL destilliertes Wasser
Towbin-Transferpuffer (10x)	150,1 g Trizma® base 720,6 g Glycerin ad 5 L destilliertes Wasser
Towbin-Transferpuffer (1x)	200 mL Towbin Transferpuffer (10x) 200 mL Methanol ad 2 L destilliertes Wasser
TBS (10x)	24,2 g Trizma® base 80 g Natriumchlorid ad 1 L destilliertes Wasser
TBST (1x)	100 mL TBST (10x) 0,5 mL Tween® 20 ad 1 L destilliertes Wasser

Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

BSA-Lösung (3 %)	3 g BSA ad 100 mL PBS ⁺⁺
BSA-Lösung (1 %)	3,33 mL BSA-Lösung (3 %) ad 10 mL PBS ⁺⁺
Citrat Puffer	10 mL Citrat Buffer pH 6.0 (10x) ad 100 mL destilliertes Wasser
EDTA Puffer	10 mL T-EDTA Buffer pH 9.0 (10x) ad 100 mL destilliertes Wasser
96 % Ethanol-Lösung	960 mL Ethanol ad 1 L destilliertes Wasser
70 % Ethanol-Lösung	700 mL Ethanol ad 1 L destilliertes Wasser
Paraformaldehyd-Lösung (4 %)	800 mL PBS ⁺⁺ 40 g Paraformaldehyd Unter Rühren auf 60 °C erhitzen Lösen durch 5 N Natriumhydroxid ad 1 L PBS ⁺⁺
TBS-Wash Buffer	40 mL Tris-Wash Buffer B (20x) 800 mL destilliertes Wasser
Triton X-100-Lösung (0,1 %)	0,1 mL Triton X-100 ad 100 mL PBS ⁺⁺

2.1.5 Gelzusammensetzung Westernblot

Tabelle 8: Gelzusammensetzung für Westernblot

Reagenzien	Trenngel (10 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel (5 %)
Millipore Wasser	4,1 mL	2,4 mL	2,3 mL
Rotiphorese®	3,3 mL	5 mL	670 µL
Tris-Salzsäure pH 8,7 mit 20 % SDS	2,5 mL	2,5 mL	-
Tris-Salzsäure pH 6,8 mit 20 % SDS	-	-	1 mL
30 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat	100 µL	100 µL	40 µL
Tetramethylethylendiamin	4 µL	4 µL	4 µL

2.1.6 Antikörper für Westernblot

Tabelle 9: Primärantikörper für Westernblot

Primärantikörper	Hersteller
Anti- <i>cleaved Caspase 3</i> (anti-Kaninchen, monoklonal, #9664, 1:1000)	CellSignaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (anti-Maus, Monoklonal, #G9295, 1:30.000)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Anti-TLR2 (anti-Kaninchen, polyclonal, #PA5-20020, 1:500)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 10: Sekundärantikörper für Westernblot

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti- <i>Rabbit-IgG</i> (anti-Ziege, HRP-gekoppelt, #7074S, 1:2000)	CellSignaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland

2.1.7 Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Tabelle 11: Primärantikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Hersteller
Anti- <i>cleaved Caspase 3</i> (anti-Kaninchen, monoclonal, #9664)	CellSignaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-CD3 (anti-Maus, monoklonal, #AM322-5M)	BioGenex, Fremont, USA
Anti-CD4 (anti-Ratte, monoclonal, #357406)	Biolegend, Amsterdam, Niederlande
Anti-Filaggrin (anti-Maus, monoklonal, # sc-66192)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-IL-1 β (anti-Kaninchen, polyklonal, #NB600-633)	Novus, Abingdon, UK
Anti-IL-8 (anti-Maus, monoklonal, #sc-376750)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-Involucrin (anti-Kaninchen, polyklonal, #ab53112)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Ki-67 (anti-Kaninchen, #KI681R06)	DCS Diagnostics, Hamburg, Deutschland
Anti-Myeloperoxidase (anti-Kaninchen, monoclonal, #14569)	CellSignaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-TNF- α (anti-Kaninchen, polyklonal, #ab6671)	Abcam, Cambridge, UK

Anti-TLR2 (anti-Kaninchen, polyclonal, #PA5-20020)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Anti-Zytokeratin-10 (anti-Kaninchen, polyclonal, #ab76318)	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 12: Sekundärantikörper für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper	Hersteller
Alexa Fluor™ 546 (anti-Ratte, #A-11081)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Histofine Simple Stain AP (Multi) (anti-Maus und anti-Kaninchen, #414262F)	Medac, Wedel, Deutschland

2.1.8 Geräte

Tabelle 13: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage ENTRIS2201-1S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Analysewaage Feinwaage Explorer Pro	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Autoklav Varioklav	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Autostainer XL	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Axio Observer Z1	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Blotting-Schlitten (Gel-Halterung)	BioRad, München, Deutschland
ChemiDoc XRS + Imager	BioRad, München, Deutschland
ElektrophoREEkammer	BioRad, München, Deutschland
Extruder LiposoFast-Basic	Avestin Inc., Ottawa, Kanada
Gefahrstoffabzug TA 1500 x 900 – 900	Waldner, Wangen, Deutschland
Gefriertrockner Christ Epsilon 2-4	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Gelkämme (1,5 mm)	BioRad, München, Deutschland
Gewebeentwässerungsmaschine REVOS	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Inkubator HERAcCell 240i	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Kühlschrank Liebherr Premium 4°C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Laminar Flow-Werkbank BioWizard Golden GL-200	Kojair Tech, Vilppula, Finnland
Magnetrührer IKA-COMBIMAG® RCT	IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
Microplate Reader	BioRad, München, Deutschland
Microtom RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Netzgerät für Elektrophorese und Blotting	BioRad, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Nikon Eclipse Ni	Nikon, Amsterdam, Niederlande
Olympus CKX41	Zeiss, Göttingen, Deutschland

Pinzetten	VWR, Darmstadt, Deutschland
Rollenmischer RM5-V	Fröbel, Lindau, Deutschland
Rotationsverdampfer Rotavapor R-114	Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz
Spacer Plates with 1,5 mm integrated spacers	BioRad, München, Deutschland
Thermomixer Mixer HC	Starlab, Hamburg, Deutschland
Tiefkühlschrank Liebherr -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Tiefkühlschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Tischzentrifuge Mini Star	VWR, Darmstadt, Deutschland
Transfer-Kammer (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell)	BioRad, München, Deutschland
Vortexer VF2	IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
Wasserbad 37°C	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad 94°C	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wippschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

2.1.9 Programme

Tabelle 14: Verwendete Programme

Programm	Hersteller
Biorender Academics	BioRender, Toronto, Kanada
GraphPad Prism7 statistical software	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Flow Cytometric Analysis Programm Array	BD, Heidelberg, Deutschland
ImageJ 1.53q	Wayne Raband, National Institutes of Health, USA
Image Lab™ Version 6.0.1	BioRad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA
Microplate Manager Software 6	BioRad, München, Deutschland
Zen 2.3 pro	Zeiss, Göttingen, Deutschland

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Loch Mikrotiterplatte, U-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Loch Mikrotiterplatte, V-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Biopsie Stanze (6 mm)	GlaxoSmithKline, London, UK
Deckgläser High Precision (24 x 60 mm)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einweg-Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Corning™ Costar™, Tewksbury, USA
Gewebe-Einbettkassetten	Sanova, Wien, Österreich
Kryoröhrchen Cellstar (1,5 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Membraneinsatz (0,4 mM, translucent)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten	WU Mainz, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Eppendorf™ Combitips Advanced™, 2,5 mL, 5 mL, 10 mL)	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
PVDF-Membran	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwämme für Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Skalpell (No. 11, No. 20)	Feather, Osaka, Japan
Superfrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Whatman® Filterpapier	GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Zellkulturlochplatten (96-, 12-, 24- und 6 Lochplatten)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, 23 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zell Sieb (100 µm)	Corning™, Tewksbury, USA
Zentrifugen Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Ethik

Die für diese Arbeit genutzten primären Zellen wurden am Universitätsklinikum Frankfurt am Main aus *Präputien*, *Hidradenitis suppurativa* Läsionen sowie nicht entzündlicher Haut von Brustreduktionen isoliert. Die *Präputien* stammen von operativ entfernten Beschneidungen von Kindern bis sieben Jahren. Die für diese Arbeit hergestellten *ex vivo* Explantate stammen aus exzidierten *Hidradenitis suppurativa* Läsionen und nicht entzündlicher Haut von Brustreduktionen. Sämtliche hier erfolgten Arbeiten mit den Zellen wurden gemäß der Deklaration von Helsinki und mit der Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt am Main (Lokale Ethik-Kommission/Institutioneller Prüfungsausschuss) durchgeführt.

2.2.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien sowie der primären Zellen erfolgte im Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 93 % unter Verwendung der entsprechenden Zellkulturmedien, welche zuvor mit PBS⁻, EDTA und Trypsin auf 37 °C erwärmt wurden. Alle Zellkulturtechniken erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank mit Ausnahme der Zellzählung.

2.2.3 Kultivierung adhärent wachsender Zellen

Um die Teilungsfähigkeit der Zellen zu erhalten, wurden diese bei einer Konfluenz von ungefähr 80 % passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und der adhärente Zellrasen einmal mit PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflasche ablösten. Zum Abstoppen des Trypsin-Verdauens wurde fötales kälberserumhaltiges Medium im Verhältnis von 3:1, bzw. Trypsininhibitor (im Verhältnis von 1:1) hinzu pipettiert und anschließend mit einer Pipette vereinzelt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm um Trypsin-Reste zu entfernen. Das entstandene Zellpellet wurde in einer entsprechenden Menge frischen Mediums resuspendiert und in der gewünschten Zelldichte in neue Zellkulturgefäße überführt.

2.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Kryokonservierung ermöglicht den Erhalt einer Zelllinie in niedrigen Passagen. Dazu wurde eine Zellsuspension in Kryomedium mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/0,8 mL angesetzt. Davon wurden je 0,8 mL in ein Kryovial pipettiert. Diese wurden anschließend mit einer Kühlrate von 1 °C/min eingefroren und danach zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen aus der Kryokultur wurden diese zügig mit 10 mL warmen Kulturmedium (37 °C) durch Resuspendieren aufgetaut. Es folgte eine Zentrifugation bei

1200 rpm für 5 min in einem 15 mL Zellkulturröhrchen. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 mL Kulturmedium resuspendiert und in eine T75 cm²-Zellkulturflasche pipettiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die weitere Kultivierung verlief wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

2.2.5 Behandlung adhärent wachsender Zellen

Für die Behandlung wurden die Zellen je nach Kulturplattengröße und Zellart in unterschiedlicher Dichte ausgesät (Tabelle 16). Nach 24 h folgte die Behandlung für verschiedene Zeiträume und Konzentrationen entsprechend der Experimente in frischem Medium.

Tabelle 16: Zelldichte/mL für die Versuchsaufbauten

Kulturplatte	HaCaT	NIH 3T3	primäre Keratinozyten	primäre Fibroblasten
96-Loch Kulturplatte	7,5x10 ³	5x10 ³	-	-
12-Loch Kulturplatte	2x10 ⁵	-	2x10 ⁵	3x10 ⁵
6-Loch Kulturplatte	-	9x10 ⁴	-	-

2.2.6 Isolation primärer Keratinozyten und Fibroblasten

Die Isolation primärer Keratinozyten und Fibroblasten fand ab Erhalt des frischen Gewebes unter sterilen Bedingungen statt. Dazu wurde das Gewebe zunächst von überflüssigem subkutanen Fett befreit und über einen Zeitraum von 4 h in einer Lösung aus PBS⁺⁺ mit 1 % Penicillin-Streptomycin gewaschen, wobei die Lösung regelmäßig gewechselt wurde. Danach wurde das Gewebe in 3-5 mm große Stücke geschnitten und zur Trennung von Epidermis und Dermis für 16 h in Thermolysin (250-500 U/100 mL) bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Für die vollständige Trennung wurden Epidermis und Dermis voneinander mit sterilen Pinzetten getrennt. Anschließend wurden die Epidermis Stücke in eine Lösung im Verhältnis von 1:1 bestehend aus Trypsin/EDTA und PBS⁻ bei 37 °C für 20 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Gemisch 2-3-mal kräftig geschüttelt, um das Lösen der Keratinozyten aus der extrazellulären Matrix mechanisch zu

unterstützen. Nach der Inkubation wurde die Suspension mit einer 5 mL serologischen Pipette gemischt und durch ein 100 µm Zellsieb gegeben. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt, indem durch das Zellsieb ein Trypsin-Inhibitor gegeben wurde, sodass ein Verhältnis von 1:1 mit der Zellsuspension entstand. Es folgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min, das entstandene Zellpellet wurde in Keratinozyten-Medium resuspendiert und in einer Zelldichte von 4×10^6 Zellen/mL in einer T175 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Drei Tage nach der Einsaat wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Für die Isolation der Fibroblasten wurden die Stücke zunächst weiter zerkleinert und für 3 h in Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Auch dieses Gemisch wurde während der Inkubationszeit mehrmals kräftig geschüttelt, um das Lösen der Fibroblasten aus der extrazellulären Matrix mechanisch zu unterstützen. Danach wurde die Suspension mit einer 25 mL serologischen Pipette gemischt und durch ein 100 µm Zellsieb gegeben. Die enzymatische Reaktion wurde durch das Zugabe des fötalen Kälberserum-haltigen Mediums durch das Zellsieb abgestoppt. Das bei der Zentrifugation (1200 rpm für 10 min) entstandene Zellpellet wurde im Fibroblasten-Medium resuspendiert und in einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/mL in einer T175 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Drei Tage nach der Einsaat wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.2.7 Kultivierung von Epidermismodellen

Für die Kultivierung von Epidermismodellen wurden die primären Keratinozyten wie in Abschnitt 2.2.2 gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst, welches dann durch den Trypsin-Inhibitor wieder gestoppt wurde. Während der 5-minütigen Zentrifugation bei 1200 rpm wurde die Zellzahl bestimmt und dann das Pellet in Keratinozyten Medium resuspendiert, sodass eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL entstand. Anschließend wurde ein Volumen entsprechend des Versuchsaufbaus (3×10^5 Zellen/Epidermismodell) entnommen und nochmals für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in *Prime-3D Medium* von CELLnTEC mit 100 µL/Epidermismodell resuspendiert. Für ein Epidermismodell wurden 500 µL *Prime-3D Medium* in die Vertiefung einer 24-Loch Zellkulturplatte pipettiert. In diese Vertiefung wurde dann mit einer Pinzette ein steriles *insert* gesetzt. Bevor 100 µL der Zellsuspension auf die Membran des *inserts* pipettiert wurden, wurde die Membran zunächst mit 100 µL *Prime-3D Medium* benetzt um eine gleichmäßigere Verteilung der Zellsuspension zu gewährleisten. Nach 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit 3D-Medium, wobei sowohl das Medium in der Vertiefung der 24-Loch Zellkulturplatte (500 µL) als auch das Medium im *insert* (100 µL) ausgetauscht wurde.

Am darauffolgenden Tag wurde das Epidermismodell an die Luftflüssigkeitsphasengrenze gebracht. Dazu wurde das Medium in der Vertiefung und im *insert* abgesaugt und dann 400 μL 3D Medium in die Vertiefung pipettiert. Dadurch wird das Epidermismodell weiterhin von unten mit allen wichtigen Nährstoffen im Medium versorgt und hat die Möglichkeit von oben zu trocknen. Dies gibt den Keratinozyten den Impuls zu differenzieren und damit alle Schichten der Epidermis auszubilden. Ab dem Hochsetzen an die Luftflüssigkeitsphasengrenze wurde das Medium in den Vertiefungen jeden zweiten Tag ausgetauscht und in dem Zuge etwaiges Medium im *insert* entfernt. Die Kultivierung von bis zu 21 Tagen erfolgte im Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 93 % (Abbildung 8).

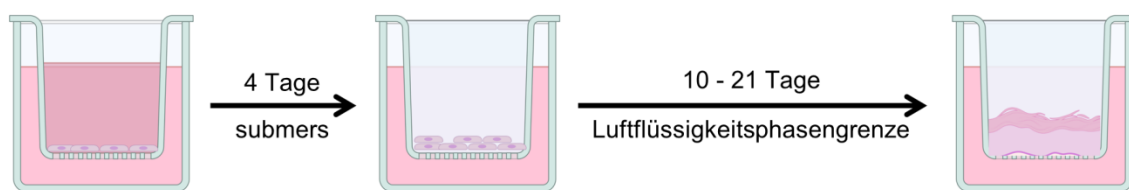


Abbildung 8: Zeitschema der Herstellung von Epidermismodellen.

Für die Herstellung von Epidermismodellen werden zunächst primäre Keratinozyten auf eine Membran gesät und submers für 4 Tage kultiviert. In dieser Zeit bilden die Zellen einen konfluenten Monolayer. Anschließend werden die Epidermismodelle an die Luftflüssigkeitsphasengrenze gehoben, wodurch die Differenzierung der Keratinozyten induziert wird. Je nach Ursprung der Keratinozyten werden die Äquivalente zwischen 10 und 14 Tagen an der Luftflüssigkeitsphasengrenze kultiviert, wonach alle Schichten der Epidermis ausgebildet sind. In Abhängigkeit des Versuchsaufbaus, können die Äquivalente bis zu 21 Tage kultiviert werden. Erstellt mit BioRender.com.

2.2.8 Präparation und Kultivierung von *ex vivo* Explantatkulturen

Die Präparation und Kultivierung der *ex vivo* Explantate fand ab Erhalt des Gewebes unter sterilen Bedingungen statt. Für die Präparation von *ex vivo* Explantaten wurde das Gewebe zunächst von überflüssigem subkutanen Fett befreit. Mit Hilfe einer 6 mm Biopsiestanze wurde die Anzahl Stanzen entsprechend des Versuchsaufbaus entnommen und anschließend auf eine Länge von 5 mm gekürzt. Diese wurden dann in *inserts* gesetzt, sodass die Epidermis nach oben zur Öffnung und die Dermis zum *insert*-Boden zeigte. Das *insert* wurde in eine 24-Loch Zellkulturplatte gesetzt, bei dem die Vertiefung 500 μL Medium, bestehend aus *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* mit 0,5 % humanen Serum, enthielt (Abbildung 9). Die weitere Kultivierung erfolgte im Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 93 % wie für das entsprechende Experiment vorgesehen.

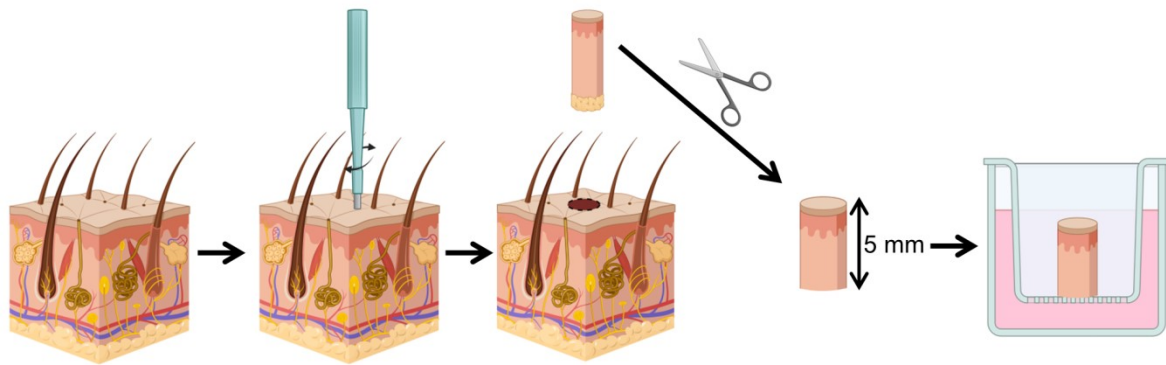


Abbildung 9: Präparation von ex vivo Explantatkulturen.

Aus dem erhaltenen Gewebe wurden mit einer 6 mm Biopsie Stanze in einer drehenden Bewegung eine Biopsie entnommen. Diese wurde dann auf eine Länge von 5 mm gekürzt und in ein *insert* platziert, sodass die Epidermis zur *insert*-Öffnung nach oben zeigte. Das *insert* mit der enthaltenen Biopsie Stanze wurden anschließend in die Vertiefung einer 24-Lochplatte, welche 500 μ L Kulturmedium enthielt, gesetzt und entsprechend des Versuchsaufbaus kultiviert. Erstellt mit Biorender.com.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Präparation von Zelllysaten

Für die Präparation der Zelllysate wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, kultiviert und nach der Behandlung mit PBS⁻ (4 °C) gewaschen und mit Ripa-Puffer für 45 min auf Eis inkubiert, mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysate bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Die Bestimmung von zellulären Proteingehalten erfolgte nach der Methode von Bradford. Dazu wurde eine vorverdünnte BSA-Standardkurve in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 1,75 μ g/mL verwendet. Von Probe und Standard wurden jeweils 4 μ L in Doppelbestimmung in eine 96-Loch Mikrotiterplatte (U-Boden) pipettiert und anschließend 200 μ L Bradford-Reagenz hinzu pipettiert. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit erfolgte

die photometrische Messung der Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Mikroplatten-Lesegerät. Der Proteingehalt der Proben konnte anhand der Absorptionswerte mit dem Programm „*Microplate Manager Software 6*“ (Bio-Rad, Neuberger) ermittelt werden.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen wurde zunächst die eindimensionale *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurden je nach zu analysierendem Target 15-20 µg Protein mit einer entsprechenden Menge an 4x SDS-Ladepuffer versetzt und für 4 min bei 94°C denaturiert. Die Proben sowie 6 µL eines Molekulargewichtsmarkers wurden in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte bei 150 V in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophorese Kammer. In Abhängigkeit der Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine wurden 10 und 15 %-ige Trenngele verwendet. In der Tabelle 8 ist die Zusammensetzung für ein Gel angegeben.

2.3.4 Westernblot-Analyse

Elektrotransfer

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angeordnetes elektrisches Feld auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen (*blotting*). Durch das „Blotten“ wurden die Proteine für die nachfolgende immunochemische Detektion zugänglich gemacht. Die Proteine wurden nach dem *wet-blot*-Verfahren in einer Transfer-Kammer (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell) der Firma Bio-Rad transferiert. Elektrodenschwämme, Whatman-Papiere und die aktivierte PVDF-Membran wurden in Transferpuffer getränkt und zusammen mit dem Gel als Sandwich in den Schlitten des Blot-Systems gespannt. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Kathode, Elektrodenschwamm, ein Whatman-Papier, Polyacrylamid-Gel, PVDF-Membran, ein Whatman-Papier, Elektrodenschwamm und Anode. Die Blot-Kassette und ein Kühlelement wurden in die mit Transferpuffer gefüllte Transfer-Kammer überführt. Das „Blotten“ erfolgte für 75 min bei 70 V.

Immunochemischer Nachweis von Proteinen

Für die Detektion der gesuchten Proteine wurden die unspezifische Bindungsstellen auf der Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde in einer 5 %-iger Milch/TBST unter Schwenken blockiert. Die Membran wurde anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper (Tabelle 9), angesetzt im entsprechenden Blockierungspuffer über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach folgte ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 10 min in TBST, gefolgt von einer einstündigen Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 10), gelöst in 5 %-iger Milch/TBST und erneut dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 10 min. Mittels Chemilumineszenz-Substrat, in dem die Membran für wenige Minuten inkubiert wurde, erfolgte die Detektion der Immunreaktion. Zum Nachweis der Proteinbanden wurden die Membranen in das „ChemiDoc XRS+ System“ gegeben, welches die Chemilumineszenz-Reaktion direkt digital visualisiert. Die Belichtungszeit der Membran richtete sich nach dem verwendeten Antikörper und lag zwischen wenigen Sekunden und 20 min.

Die digitalisierten Proteinbanden wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms „ImageJ 1.52n“ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) quantifiziert. Dazu wurde die optische Dichte der Proteinbanden bestimmt und damit ein Maß für die Expression der Proteine geliefert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und zur Aufbewahrung getrocknet.

2.4 Antikörperfärbungen auf Paraffinschnitten

2.4.1 Vorbereitung der Paraffinblöcke

Die Epidermismodelle sowie die *ex vivo* Explantate wurden über Nacht in 4 % Phosphatgepuffertem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die fixierten Epidermismodelle und humanen Biopsien zur Paraffinierung in Plastikkassetten überführt, wobei die Epidermismodelle zusätzlich zwischen zwei Schwämme in der Plastikkassette eingebettet wurden. Die nachfolgenden Schritte dieses Abschnitts wurden von dem histologischen Labor der Dermatologie der Universitätsklinik Frankfurt am Main durchgeführt. In der automatischen Gewebeentwässerungsmaschine REVOS der Firma Thermo Scientific wurden die Biopsien und Epidermismodelle nacheinander mit Formalin, Alkohol, Xylol und zum Schluss mit Paraffin infiltriert. Die getrockneten Biopsien und Membranen der

Epidermismodelle wurden in Einbettformen aus Edelstahl platziert, in flüssigem Paraffin eingebettet und mit einem Plastikdeckel abgedeckt. Zur Aushärtung wurden die Blöcke auf eine Kühlplatte gelegt. Schließlich wurden 4 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträgern bei 62 °C im Wärmeschrank für 20 min getrocknet. Die angefertigten Schnitte konnten nun mit verschiedenen Antikörpern und Methoden angefärbt werden.

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin Färbung lassen sich Aussagen zur Morphologie des Gewebes oder der Epidermismodelle treffen. Die Hämatoxylin-Eosin Färbung wurde im Autostainer XL der Firma Leica vom histologischen Labor der Dermatologie der Universitätsklinik Frankfurt am Main gefertigt. Dazu durchliefen die Objektträger folgendes Programm:

Xylol I	6 min
Xylol II	6 min
Xylol III	6 min
Isopropanol I	1,5 min
Isopropanol II	1,5 min
96 % Ethanol	1,5 min
Leitungswasser	1,5 min
Hämatoxylin-Färbelösung	10 min
Destilliertes Wasser	3 min
1 % Salzsäure/Alkohol	2 sec
Leitungswasser	4 min
96 % Ethanol	4 min
Alkoholische Eosinfärbelösung	30 sec
96 % Ethanol	30 sec
96 % Ethanol	1 min
Isopropanol I	1,5 min
Isopropanol II	1,5 min
Xylol I	2 min
Xylol II	2 min

Zuletzt wurde das Eindeckmedium Entellan® auf den Objektträger getropft und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

2.4.3 Immunhistochemische Färbungen

Zu Beginn der Antikörperfärbung wurden die Schnitte auf der Heizplatte bei 60 °C für 2 min geglättet. Daran schloss sich das Entparaffinieren an, welches nach dem folgenden Schema verlief:

Xylol I	5 min
Xylol II	5 min
Xylol III	5 min
Isopropanol I	3 min
Isopropanol II	3 min
96 % Ethanol	3 min
70 % Ethanol	3 min
Destilliertes Wasser	5 min

Anschließend wurden die Schnitte zur Demaskierung der Antikörper Epitope 20 min bei 94 °C in 1x Citrat- oder EDTA-Puffer im Wasserbad gekocht. Nach dem Kochen mussten die Objektträger für weitere 20 min bei Raumtemperatur abkühlen. Bevor die Primärantikörper (Tabelle 11) auf die Schnitte gegeben werden konnten, wurden die Objektträger zunächst für 5 min mit destilliertem Wasser, dann für 5 min mit der entsprechenden Waschlösung aus (Tabelle 17) gewaschen. Die Primärantikörper wurden wie in angegeben verdünnt und 30 µL der Lösung auf den Schnitt pipettiert. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden diese über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer mit der Antikörperlösung inkubiert.

Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 min in der entsprechenden Waschlösung gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Danach folgte ein zweimaliger Waschschrift für jeweils 5 min mit der entsprechenden Waschlösung. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit einer Substratlösung bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Diese Inkubationszeit richtete sich nach dem verwendeten Antikörper und lag zwischen wenigen Sekunden und 20 min. Schließlich wurden die Schnitte für 2 min in destilliertem Wasser gewaschen. Die Zellkerne wurden dann mit Hämatoxylin für 2 min gegengefärbt und anschließend in Leitungswasser für 3 min gebläut. Bevor die Objektträger eingedeckt werden konnten, mussten sie entwässert werden, was nach dem folgenden Schema verlief:

96 % Ethanol I	} kurz eintunken
96 % Ethanol II	
Isopropanol I	3 min
Isopropanol II	3 min
Xylol I	3 min
Xylol II	3 min

Zuletzt wurde das Eindeckmedium Entellan® auf den Objektträger getropft und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

Tabelle 17: Lösungen und Verdünnungsfaktor für die immunhistochemischen Färbungen

Antikörper	Waschlösung	Verdünnungslösung	Verdünnung
Anti- <i>cleaved Caspase 3</i>	1x TBS	<i>Antibody Diluent</i>	1:1000
Anti-CD3	1x TBS	-	<i>Ready-to-use</i>
Anti-Filaggrin	1x TBS	<i>Antibody Diluent</i>	1:200
Anti-IL-1 β	1x TBS	<i>Antibody Diluent</i>	1:100
Anti-IL-8	PBS ⁺⁺	1 % BSA/PBS ⁺⁺	1:60
Anti-Involucrin	1x TBS	<i>Antibody Diluent</i>	1:1000
Anti-Ki-67	1x TBS	-	<i>Ready-to-use</i>
Anti-Myeloperoxidase	1x TBS	<i>Antibody Diluent</i>	1:1000
Anti-TNF- α	1x TBS	<i>Antibody Diluent</i>	1:100
Anti-TLR2	1x TBS	<i>Antibody Diluent</i>	1:500
Anti-Zytokeratin-10	1x TBS	<i>Antibody Diluent</i>	1:5000

2.4.4 CD4 Immunfluoreszenzfärbung

Zu Beginn der CD4 Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte auf der Heizplatte bei 60 °C für 2 min geglättet. Daran schloss sich das Entparaffinieren an, welches im Abschnitt 2.4.3 der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde.

Anschließend wurden die Schnitte zur Fixierung für 15 min in 4 %-igem Paraformaldehyd in der Feuchtkammer inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Schnitte in 0,1 %-iger Triton X-100 Lösung für 10 min permeabilisiert und für 1 h in 3 %-igem BSA blockiert. Der CD4-Antikörper (Tabelle 11) wurde 1:200 in 1 % BSA/PBS⁺⁺ verdünnt und 30 μ L der Lösung auf den Schnitt pipettiert. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden diese in einer Feuchtkammer mit der Antikörperlösung für 1 h inkubiert.

Nach der Inkubation des Primär-Antikörpers wurden die Schnitte gewaschen. Dazu wurden zunächst dreimal 150 μ L PBS⁺⁺ auf die Schnitte pipettiert und jeweils wieder mittels Pipette abgezogen. Dann wurden die Schnitte zweimal für jeweils 10 min in PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 12, 1:1000) in 1 %-iger BSA-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Danach folgte wieder der zweistufige Waschschrift. Im nächsten Schritt wurden die Zellkerne für 10 min mit DAPI gefärbt. Vor dem Eindecken der Schnitte, wurden auf diese wieder dreimal 150 μ L PBS⁺⁺ pipettiert und jeweils mittels Pipette wieder abgezogen. Dann wurden die Schnitte zweimal für jeweils 10 min in PBS⁺⁺ und nochmals für 10 min in destilliertem Wasser gewaschen.

Zuletzt wurde Fluoromount-G auf den Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

2.4.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Cleaved Caspase 3-Färbung

Für die Auswertung der *cleaved Caspase 3*-Färbung wurden Bilder der Schnitte mit dem Nikon Eclipse Ni Mikroskop aufgenommen. Anschließend wurden die *cleaved Caspase 3* positiven und negativen Zellen gezählt, wobei zwischen Epidermis und Dermis unterschieden wurde. Die *cleaved Caspase 3* positiven Zellen wurden dann ins Verhältnis zu den gesamt gezählten Zellen gesetzt.

Differenzierungsmarker der Epidermis

Für die Auswertung der Expressionsintensität der Differenzierungsmarker (Filaggrin, Involucrin und Zytokeratin-10) der Epidermis wurden gleich große Bilder im Bereich der Epidermis mit dem Nikon Eclipse Ni Mikroskop aufgenommen. Anschließend wurde nach Festlegung eines *Thresholds* der *mean gray value* (mittlere Grauwert) mit dem Programm ImageJ 1.53q (Wayne Raband, National Institutes of Health, USA) ermittelt.

Epidermisdicke

Für die Auswertung der epidermalen Dicke wurden Bilder vom Bereich der Epidermis mit dem Nikon Eclipse Ni Mikroskop aufgenommen. Anschließend wurde die Länge der Epidermis vom *Stratum basale* bis einschließlich *Stratum granulosum* an fünf Stellen der Epidermis mit dem Programm ImageJ 1.53q (Wayne Raband, National Institutes of Health, USA) ausgemessen. Aus den fünf Werten wurde dann der Mittelwert gebildet.

Immunzell-, Zytokin- und Toll-like Rezeptor 2-Färbung

Für die Auswertung der CD3- und CD4-T-Zellen-, neutrophilen Granulozyten-, IL-1 β -, IL-8-, TNF- α - und TLR2-Färbung wurden im Bereich des *Stratum papillare* drei Bilder mit dem Olympus CKX41 bzw. Axio Observer Z1 Mikroskop aufgenommen. Anschließend wurden die positiven sowie negativen Zellen gezählt und die positiven Zellen ins Verhältnis zu den gesamt gezählten Zellen gesetzt. Aus den Werten der drei Bilder wurde dann der Mittelwert gebildet.

Proliferationsmarker Ki-67-Färbung

Für die Auswertung der Ki-67-Färbung wurden Bilder vom Bereich der Epidermis mit dem Nikon Eclipse Ni Mikroskop aufgenommen. Anschließend wurden die Ki-67 positiven und negativen Zellen in der Epidermis gezählt und die positiven Zellen ins Verhältnis zu den gesamt gezählten Zellen gesetzt.

2.5 Toxizitätsbestimmungen

2.5.1 Zell-Proliferations-Reagent WST-1

Mit Hilfe des *water soluble tetrazolium* (WST) kann eine intakte Atmungskette in Zellen nachgewiesen werden. Lebensfähige Zellen mit einer intakten mitochondrialen Dehydrogenase setzen das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz des WST-1 (4-[3-(4-Iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in das dunkelrote Formazan um. Dieser Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden. Dazu wurden Zellen entsprechend des Versuchsaufbaus in Fünffachbestimmung in eine 96-Loch Zellkulturplatte ausgesät und behandelt. Danach erfolgte ein Waschschriff mit PBS⁻ und die Zugabe von 100 µL Zell-spezifischen Mediums für 24 h. Das WST-1 Reagenz wurde im Verhältnis von 1:10 eingesetzt und nach einminütigem Schwenken für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Farbreaktion fand nach 2 h Inkubation bei 450 nm sowie 595 nm statt. Die Differenz der Absorptionswerte 450 nm und 595 nm wurde gemittelt, die Kontrolle wurde auf 100 normiert und die Behandlungen auf die Kontrolle bezogen.

2.5.2 Laktat Dehydrogenase Assay

Der Laktat-Dehydrogenase Assay ist ein Zelltod- bzw. Zytotoxizitätstest. Das stabile Enzym Laktat-Dehydrogenase kommt in allen Zelltypen vor und wird bei einer Schädigung der Plasmamembran schnell in Zellkulturmedium freigesetzt. Ein gesteigertes Level an toten oder plasmamembrangeschädigten Zellen führt zu erhöhter Laktat-Dehydrogenase-Aktivität im Zellkulturmedium. Dieser Anstieg korreliert direkt mit der gebildeten Menge an Formazan und kann photometrisch gemessen werden. Das Medium der Epidermismodelle wurde im

Verhältnis von 1:1 mit dem frisch angesetzten Katalysator (1:46 in der Farbstoff-Lösung) in Doppelbestimmung in einer 96-Lochplatte im Dunklen für 2-30 min inkubiert. Die photometrische Messung der Farbreaktion fand bei einer Wellenlänge von 490 nm statt.

Zur Bestimmung der prozentualen Zytotoxizität wurde der Absorptionswert der Hintergrundkontrolle vom gemessenen Absorptionswert subtrahiert. Die erhaltenen Werte der Doppelbestimmungen wurden gemittelt und anschließend in die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{(\text{gemessener Wert} - \text{niedrige Kontrolle})}{(\text{hohe Kontrolle} - \text{niedrige Kontrolle})} \times 100$$

Die niedrige Kontrolle entspricht dabei den unbehandelten Epidermismodellen, für die hohe Kontrolle wurde ein Epidermismodell entsprechend des Versuchsaufbaus für 2 oder 24 h mit 1 % Triton-X 100 behandelt.

2.6 Zytokin Messungen

2.6.1 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Um die Zytokin Ausschüttung der *ex vivo* Explantate und der Epidermismodelle zu messen, wurde der DuoSet® *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* von R&D Systems™ durchgeführt, bei dem es sich um einen *Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay* handelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Konzentrationen von IL-1β und TNF-α im Medium der *ex vivo* Explantaten und Epidermismodelle wie folgt nachgewiesen:

Zunächst wurden 4 µg/mL des *Capture*-Antikörpers über Nacht bei Raumtemperatur in einer 96-Loch Mikrotiterplatte mit U-Boden inkubiert und anschließend überflüssiger *Capture*-Antikörper abgewaschen. Daran schloss sich eine einstündige Blockierung der Antikörper Epitope mit *Reagent Diluent* an. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift. Als nächstes wurden die Standardreihe und die Proben in Doppelbestimmung in die Mikrotiterplatte pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Standardreihe des IL-1β *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* verlief von 0-250 pg/mL und die des TNF-α *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* von 0-1000 pg/mL. Nach weiteren dreimaligen Waschschriften, folgte die Zugabe des *Detection*-Antikörpers (1:60 in *Reagent-Diluent*). Es folgte ein

dreimaliger Waschschrift. Danach wurde Streptavidin-HRP 40-fach verdünnt für 20 min bei Raumtemperatur hinzugegeben, wobei direktes Licht vermieden wurde. Wieder schloss sich dreimaliges Waschen an. Im nächsten Schritt wurde die Substratlösung pipettiert, die für 20 min bei Raumtemperatur, vor direktem Licht geschützt, inkubierte. Gestoppt wurde diese Reaktion durch die Zugabe der Stopplösung. Im Mikroplatten-Lesegerät wurde dann die optische Dichte der Standardkurve und Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 550 nm gemessen. Mit Hilfe des Programms „*Microplate Manager Software 6*“ (BioRad, München, Deutschland) wurde eine 4-Parametrische Kalibrierungskurve berechnet mit der die Konzentration der Proben ermittelt werden konnte.

2.6.2 Cytometric Bead Assay

Die Durchführung und Konzentrationsermittlung des BD™ *Cytometric Bead Assay* fand am Fraunhofer-Institut für Translationale Medizin und Pharmakologie ITMP statt.

Zu Beginn wurden 25 µL des Standardmixes und 25 µL der Proben in Doppelbestimmung in die Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte mit V-Boden pipettiert und 25 µL des *capture beads*-Mixes hinzu pipettiert. Dann wurde die Mikrotiterplatte für 5 min bei 500 rpm auf den Schüttler gestellt, wonach sich eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur anschloss. Nach der Inkubation wurden 25 µL *mixed Phycoerythrin detection reagent* hinzugefügt und die Mikrotiterplatte wieder für 5 min bei 500 rpm auf den *Shaker* gestellt. Die anschließende Inkubation fand bei Raumtemperatur für 2 h, vor Licht geschützt, statt. Um noch enthaltene Medium Bestandteile auszuwaschen, wurden 150 µL Waschpuffer in die Vertiefungen pipettiert, die Platte bei 400 g für 5 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 150 µL Waschpuffer resuspendiert und nochmals für 5 min bei 500 rpm auf den Schüttler gestellt. Dann fand die Messung im Durchflusszytometer statt, bei der 300 Events pro *bead-set* gezählt wurden. Mit Hilfe des Programms *Flow Cytometric Analysis Programm Array* (BD, Heidelberg, Deutschland) wurde eine 4- und 5-parametrische Kalibrierungskurve berechnet mit der die Konzentration der Proben aus den mittleren Fluoreszenzen errechnet werden konnte. Die ermittelten Konzentrationen wurden anschließend auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

2.7 Rifampicin-Nanoformulierung

Die Rifampicin-Nanoformulierung wurde im Institut für Pharmazeutische Technologie der Goethe Universität Frankfurt von Frau Chantal Wallenwein hergestellt und für präklinische Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Dazu wurden für die Herstellung Phospholipide und Rifampicin in Methanol aufgelöst. Mit einem Rotationsverdampfer wurde im nächsten Schritt das Lösungsmittel entfernt und der Lipidfilm mit Ascorbinsäure-haltiger PBS Lösung hydratisiert. Die anschließende Größenreduktion erfolgte mit einem LiposoFast-basic Extruder. Im letzten Schritt wurde die Formulierung mit einem Christ Epsilon 2-4 LSC Gefriertrockner gefriergetrocknet um so dem Abbau des Wirkstoffs durch Oxidation und Hydrolyse entgegenzuwirken und gleichzeitig die Stabilität der Formulierung zu steigern. (179) Die Rifampicin-Nanoformulierung wurde so überreicht, dass sie durch die Zugabe von sterilem Millipore Wasser ein Gel mit einer Rifampicinkonzentration von 0,3 % bildete.

2.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung aller Rohdaten wurde mit Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt. Die statistische Auswertung und Darstellung aller Ergebnisse erfolgten mittels GraphPad Prism Version 5. Der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunns multiplen Vergleichstest wurde verwendet, um die statistische Signifikanz von Ergebnissen zu bewerten, deren Kontrollen normiert wurden. Für die Bewertung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse, deren Kontrollen nicht normiert wurden, fand der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test Anwendung. Ein P Wert $\leq 0,05$ als signifikant angesehen wurde. Die Darstellung von Ergebnissen als Box Plots wurde genutzt, um die biologische Varianz innerhalb der Gruppe zu visualisieren.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung von *Hidradenitis suppurativa* Zellkulturmodellen

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene *Hidradenitis suppurativa* Zellkulturmodelle zu etablieren. Da die Grundlagenforschung der *Hidradenitis suppurativa* bislang nur Monolayer Zellkulturen und Explantatkulturen umfasste, wurde der Fokus auf *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle gesetzt. Zusätzlich sollten *ex vivo* Explantatkulturen etabliert werden, welche sich aufgrund ihrer *in vivo*-Nähe hervorragend für Untersuchungen von Arzneimittelwirkungen und die Suche nach Biomarkern eignen. Für die Charakterisierung der neu etablierten *Hidradenitis suppurativa* Zellkulturmodelle wurden verschiedene Parameter wie Morphologie, Expression epidermaler Differenzierungsmarker und Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten näher beleuchtet.

3.1.1 Epidermale Differenzierung bei *Hidradenitis suppurativa*

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie das Verteilungsmuster der Differenzierungsmarker Filaggrin, Involucrin, Zytokeratin-10 sowie der Proliferationsmarker Ki-67 in der Epidermis von *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten exprimiert ist, wurden diese in Biopsien von *Hidradenitis suppurativa* Läsionen und nicht entzündlicher Haut aus Brustreduktionen als gesunde Kontrollen, immunhistologisch untersucht. Anhand der Hämatoxylin-Eosin Färbung wurde ersichtlich, dass die Epidermis der *Hidradenitis suppurativa* im Vergleich zu nicht entzündlicher Haut dicker war und unregelmäßig viele Reteleisten aufwies. Die Intensität von Filaggrin war bei *Hidradenitis suppurativa* im Vergleich zu nicht entzündlicher Haut reduziert, hingegen war Involucrin in der nicht entzündlichen Haut schwächer exprimiert als in *Hidradenitis suppurativa*. Während die Verteilung von Involucrin in der nicht entzündlichen Haut auf das *Stratum granulosum* limitiert war, erstreckte es sich in *Hidradenitis suppurativa* bis zum *Stratum spinosum*. Der immunhistologische Nachweis von Zytokeratin-10 deutete auf eine verminderte Expression in *Hidradenitis suppurativa* verglichen mit der nicht entzündlichen Haut hin, wobei sich die Distribution von Zytokeratin-10 sowohl in der Epidermis der *Hidradenitis suppurativa* als auch in der nicht entzündlichen Haut nicht unterschied. Die Quantifizierung proliferationsfähiger Keratinozyten in der Epidermis zeigte vermehrt Ki-67(+) Keratinozyten in *Hidradenitis suppurativa* im Vergleich zur nicht entzündlichen Haut. Im Gegensatz zur nicht entzündlichen Haut befanden sich in der *Hidradenitis suppurativa* Epidermis auch Ki-67(+) Keratinozyten im *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* (Abbildung 10).

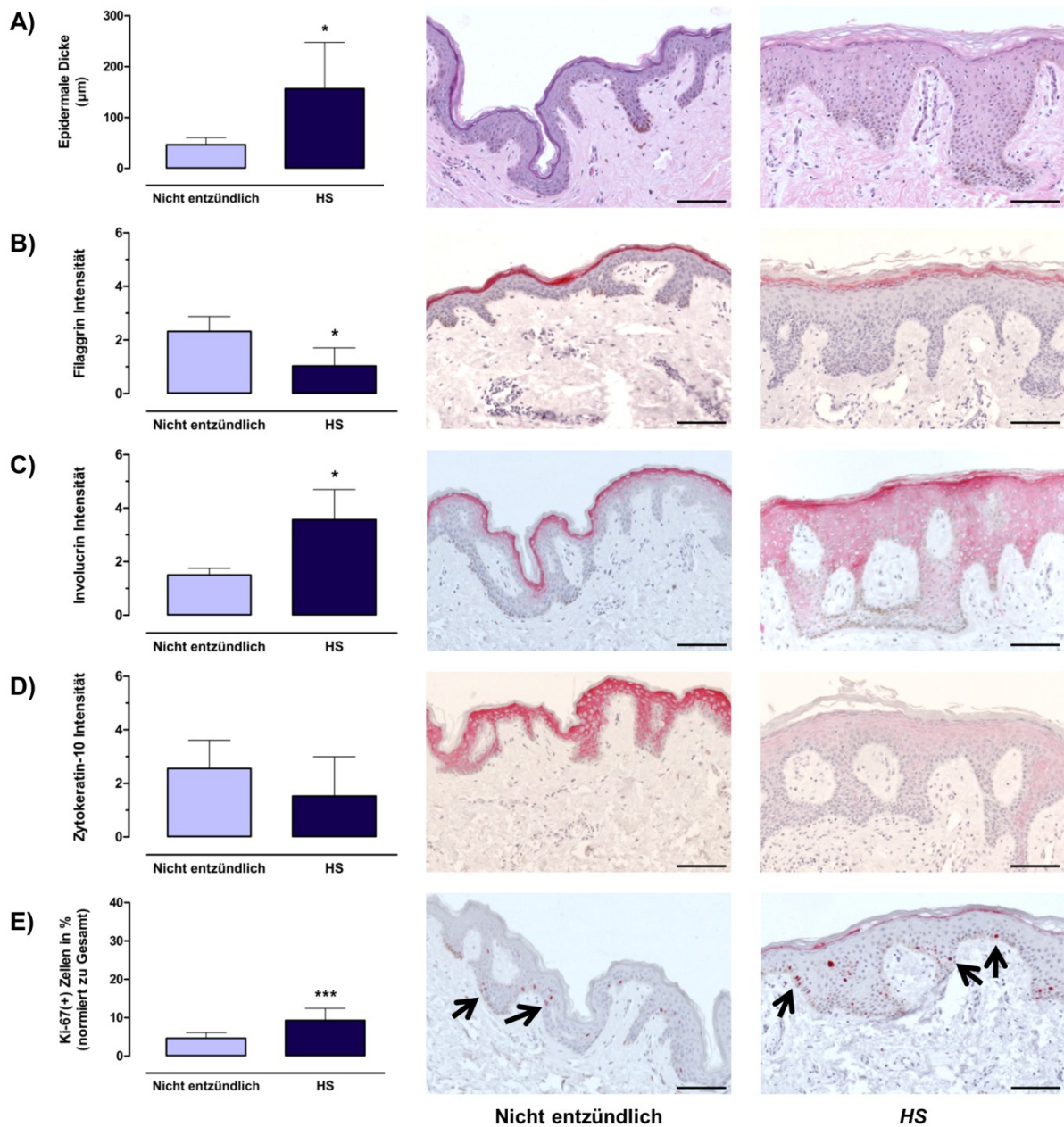
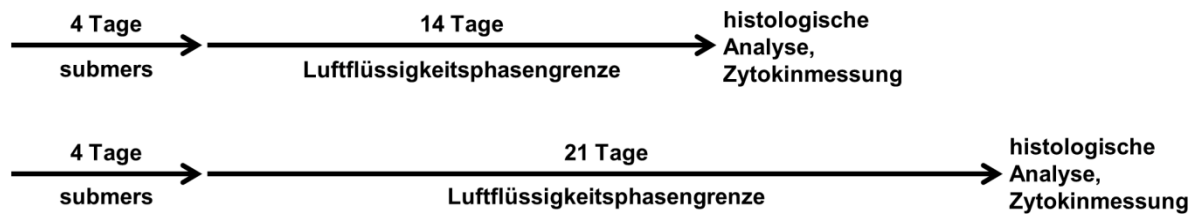


Abbildung 10: Epidermale Differenzierung von nicht entzündlichen und läSIONALen *Hidradenitis suppurativa* Biopsien.

Durch immunhistochemischen Nachweis wurden Biopsien aus nicht entzündlicher und läSIONALer *Hidradenitis suppurativa* Haut mittels A) Hämatoxylin-Eosin, B) Filaggrin-, C) Involucrin-, D) Zytokeratin-10- und E) Ki-67-Färbung hinsichtlich epidermaler Differenzierung untersucht. Gezeigt werden repräsentative Biopsie Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (Hämatoxylin-Eosin $n = 5$; Filaggrin $n = 5$; Involucrin $n = 5$; Zytokeratin-10 $n = 5$; Ki-67 $n = 9$; Maßstabsbalken = 100 μm ; schwarze Pfeile = Ki-67(+) Zellen). Die p -Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$. (Haferland *et al.* 2024, Zustimmung der Co-Autoren wurde eingeholt)

3.1.2 *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle

Versuchsaufbau:



Die Epidermismodelle aus *Hidradenitis suppurativa* und *Präputium* wurden nach 4 Tagen submerser Kultivierung an die Luftflüssigkeitsphasengrenze gehoben. In diesem Zustand wurden sie für 14 oder 21 Tage kultiviert. Sowohl Keratinozyten aus *Hidradenitis suppurativa* Gewebe als auch aus *Präputium* bildeten multiple, stratifizierte Zellschichten. Beim Vergleich der Morphologie der Epidermismodelle aus *Hidradenitis suppurativa* und *Präputium* war kein Unterschied in der epidermalen Dicke zu erkennen, während die Dicke des *Stratum corneum* mit längerer Kultivierung zunahm. Der immunhistologische Nachweis zeigte, dass die Intensität der Filaggrin Expression in den *Hidradenitis suppurativa* Modellen im Vergleich zu denen aus *Präputium* vermindert war. Dieser Effekt wurde auch bei längerer Kultivierung beobachtet. Im Vergleich zu den aus *Präputium* gewonnenen Epidermismodellen, war Involucrin in den aus *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodellen intensiver exprimiert, unabhängig von der Kultivierungsdauer. Die Färbung von Zytokeratin-10 zeigte eine geringere Intensität in den *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodellen im Vergleich zu den *präputialen* Epidermismodellen nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen, welche auch bei längerer Kultivierung in dem Verhältnis bestehen blieb. Außerdem wiesen die *präputialen* Epidermismodellen nach 14 Tagen Kultivierung tendenziell weniger Ki-67(+) Keratinozyten auf, als die Epidermismodelle aus *Hidradenitis suppurativa*. Bei längerer Kultivierung der Epidermismodelle verloren die Keratinozyten ihre Fähigkeit zur Proliferation nicht (Abbildung 11).

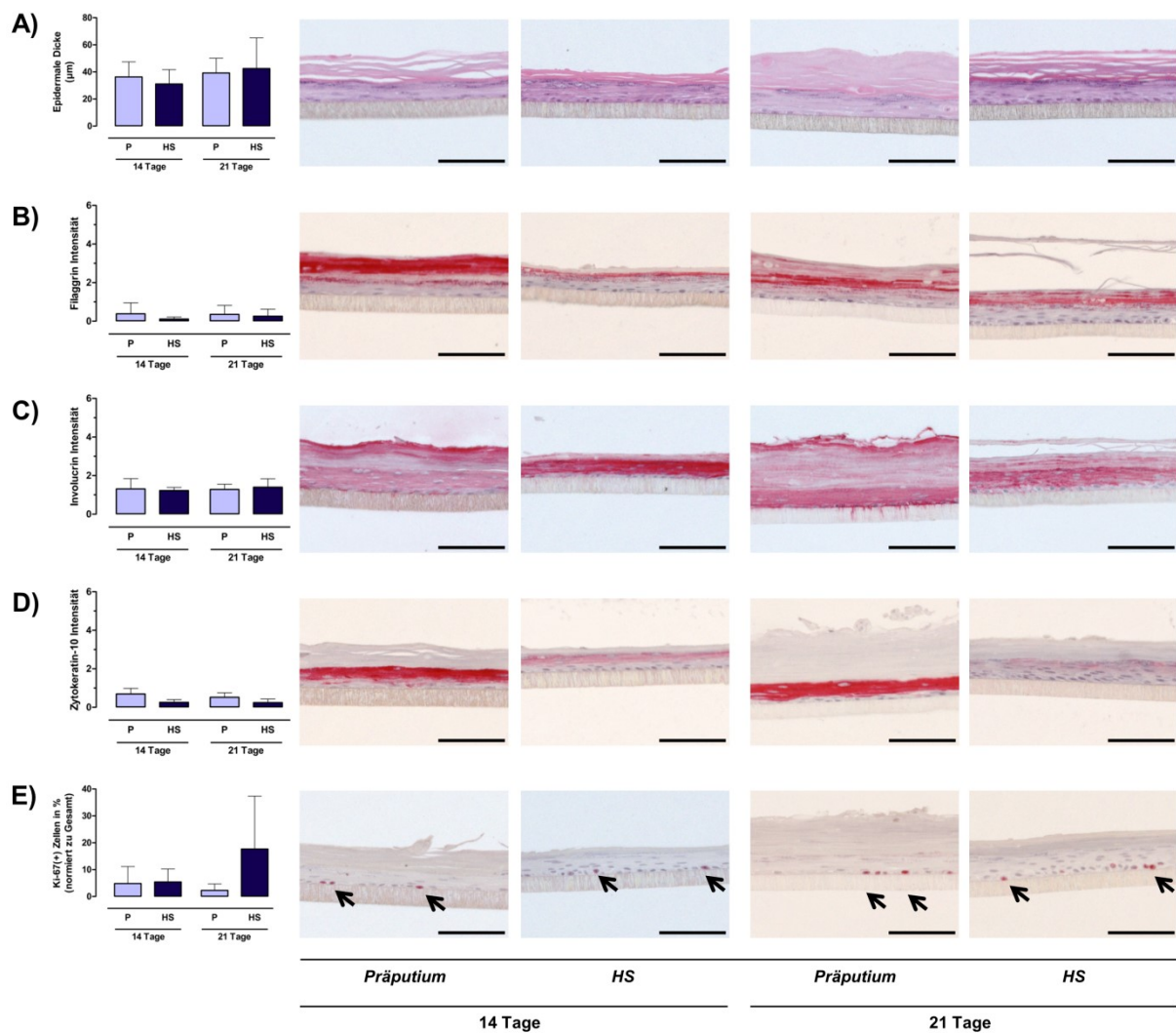


Abbildung 11: Epidermale Differenzierung der Epidermismodelle aus *Präputium* und *Hidradenitis suppurativa*.

Durch immunhistochemischen Nachweis wurden die Epidermismodelle aus *Präputium* (P) und *Hidradenitis suppurativa* (HS) Keratinozyten mittels A) Hämatoxylin-Eosin, B) Filaggrin-, C) Involucrin-, D) Zytokeratin-10- und E) Ki-67-Färbung hinsichtlich epidermaler Differenzierung untersucht. Gezeigt werden repräsentative Epidermismodell-Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3; Maßstabsbalken = 100 μ m; schwarze Pfeile = Ki-67(+) Keratinozyten). Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. (Haferland *et al.* 2024, Zustimmung der Co-Autoren wurde eingeholt)

Für die Untersuchung der Epidermismodelle aus *Hidradenitis suppurativa* Keratinozyten hinsichtlich ihrer IL-1 β und TNF- α Sekretierung, wurden diese beiden Zytokine im Medium der Epidermismodelle nach Ende der Kultivierungszeit gemessen. Die IL-1 β Messung zeigte eine erhöhte Ausschüttung durch die *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle im Vergleich zu den *präputialen* Epidermismodellen nach 14 Tagen Kultivierung. Hingegen war ein tendenziell erhöhtes IL-1 β Level nach einer Kultivierung von insgesamt 21 Tagen im Medium der *präputialen* Epidermismodellen zu beobachten. Nach 14-tägiger Kultivierung

deutete die Menge an ausgeschüttetem TNF- α auf eine tendenziell höhere Sekretion durch die *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle hin. Bei einer längeren Kultivierung war weder in den *präputialen* Epidermismodellen noch in denen aus *Hidradenitis suppurativa* TNF- α im Medium messbar (Abbildung 12).

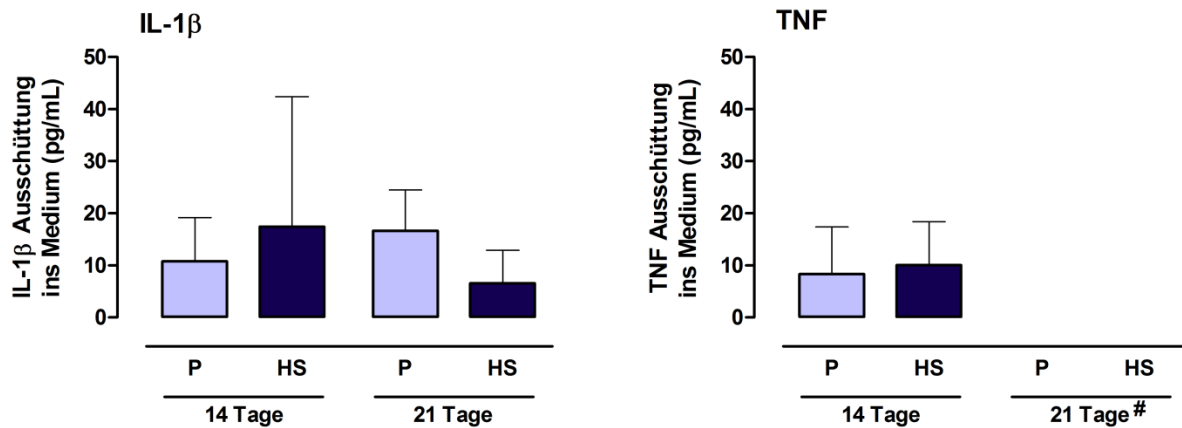


Abbildung 12: Inflammatorisches Profil der Epidermismodelle aus *Präputium* und *Hidradenitis suppurativa*.

Im Medium der Epidermismodelle aus *Präputium* (P) und *Hidradenitis suppurativa* (HS) Keratinozyten Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* gemessen. Dargestellt sind die Messwerte als Mittelwert \pm Standardabweichung (n 14 Tage = 24, n 21 Tage = 3; # = unterhalb der Nachweisgrenze). Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. (Haferland *et al.* 2024, Zustimmung der Co-Autoren wurde eingeholt)

3.1.3 *Ex vivo* Explantate

Versuchsaufbau:



Für die Etablierung dieses Systems wurden *ex vivo* Explantate aus nicht entzündlicher Haut von Brustreduktionen und aus läSIONALER *Hidradenitis suppurativa* Haut gewonnen. Die Gewebebiopsien wurden für 24 h und 48 h, mit erneutem Mediumwechsel nach 24 h, kultiviert. Um die Morphologie der *ex vivo* Explantate und damit den Einfluss der Kultivierung auf die Explantate beurteilen zu können, wurden Schnitte immunhistologisch mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Im Vergleich zu den direkt fixierten Kontrollen, zeigte sich im

gesamten Kultivierungszeitraum kein Kultivierungseinfluss auf die Morphologie der Explantate (Abbildung 13).

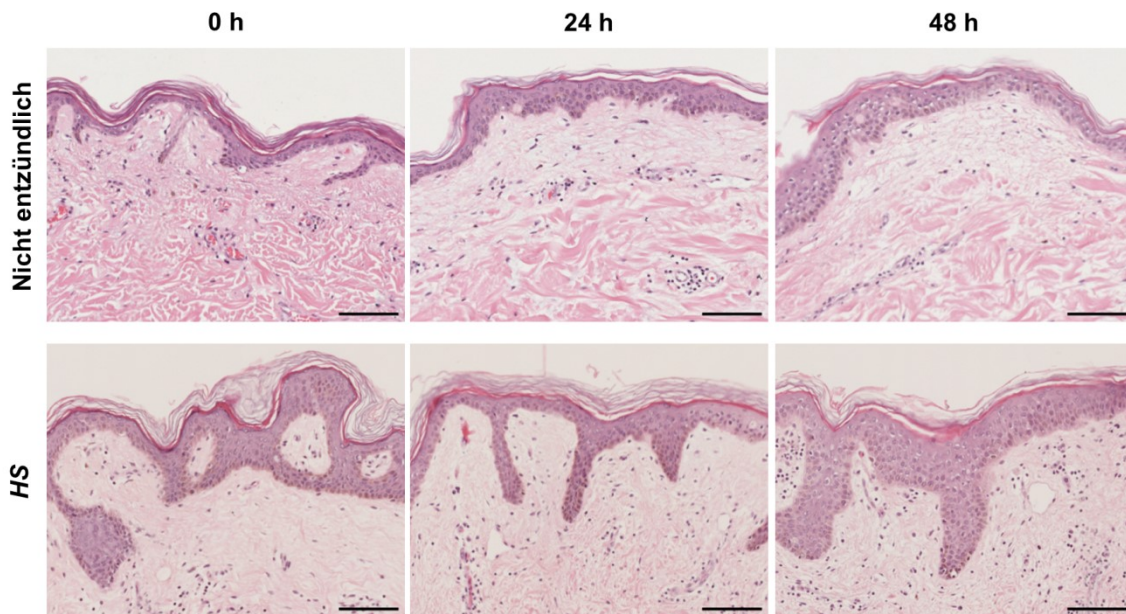


Abbildung 13: Kultivierungseinfluss auf die Morphologie von nicht entzündlichen und *Hidradenitis suppurativa* ex vivo Explantaten.

Explantate aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa* (HS) wurden für die morphologische Beurteilung zu verschiedenen Kulturzeitpunkten fixiert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Als Kontrolle dienten direkt nach der Operation fixierte Gewebestücke (0 h). Abgebildet sind repräsentative Schnitte (Nicht entzündlich n = 3; *Hidradenitis suppurativa* n = 5; Maßstabsbalken = 100 µm).

Um zu überprüfen, ob die Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten während der Kultivierung erhalten bleibt, wurden die proliferationsfähigen Keratinozyten quantifiziert. Die Quantifizierung der Ki-67(+) Keratinozyten wies sowohl in nicht entzündlichen als auch in *Hidradenitis suppurativa* Explantaten auf keinen Verlust der Proliferationsfähigkeit während der Kultivierung hin (Abbildung 14).

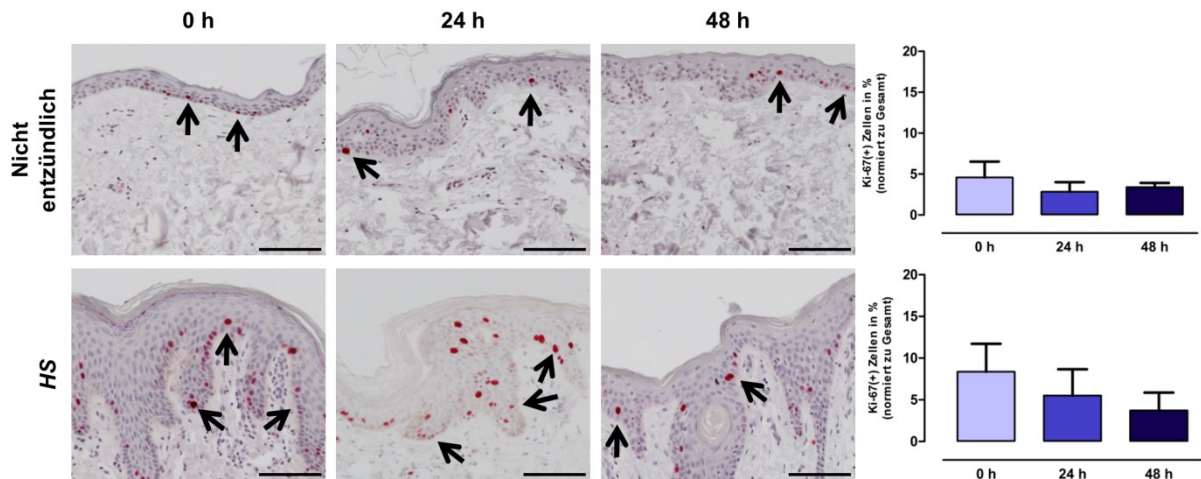


Abbildung 14: Kultivierungseinfluss auf die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten in nicht entzündlichen und *Hidradenitis suppurativa* ex vivo Explantaten.

Explantate aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa* (HS) wurden für die Beurteilung der Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten zu verschiedenen Kulturzeitpunkten fixiert. Als Kontrolle dienten direkt nach der Operation fixierte Gewebestücke (0 h). Es erfolgte der immunhistologische Nachweis mittels Ki-67 Färbung sowie die Quantifizierung. Abgebildet sind repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (n nicht entzündlich = 3; n *Hidradenitis suppurativa* = 5; Maßstabsbalken = 100 μ m; schwarze Pfeile = Ki-67(+) Keratinozyten). Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet.

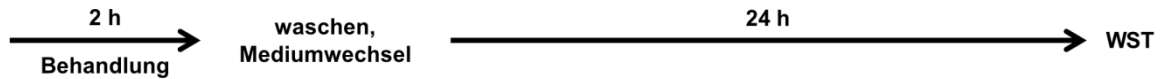
3.2 *In vitro* Behandlungen mit Rifampicin

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekulare Wirkung von Rifampicin in *Hidradenitis suppurativa* zu untersuchen und einen aussagekräftigen Biomarker für die Wirksamkeit der Rifampicin-Nanoformulierung zu finden. Dafür wurde zunächst ein Konzentrationsbereich von Rifampicin ermittelt, der sich nicht toxisch auf die etablierten *Hidradenitis suppurativa* Zellkulturmodelle auswirkte.

3.2.1 Toxizität einer Rifampicinbehandlung

3.2.1.1 Toxizität einer Rifampicinbehandlung in Monolayer

Versuchsaufbau in Zelllinien:



Zunächst wurden A) HaCaT Keratinozyten und B) NIH 3T3 Fibroblasten, die als standardisierte Zellkulturen für zytotoxische Untersuchungen verwendet werden, mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen für 2 h behandelt. Staurosporin diente hierbei als Positivkontrolle für verminderte Zellviabilität. Eine 2-stündige Behandlung mit 1 μ M Staurosporin hemmte die Zellviabilität der humanen HaCaT Keratinozyten und murinen NIH 3T3 Fibroblasten signifikant (Abbildung 15). Des Weiteren wurde die Zellviabilität der NIH 3T3 durch die Behandlung mit 1,2 mM Rifampicin signifikant inhibiert, während die niedrigeren Konzentrationen sowohl in den HaCaT als auch in den NIH 3T3 keinen Einfluss auf die Zellviabilität nahmen. Auch die 1 %-ige Lösungsmittelkontrolle (DMSO) verringerte die Zellviabilität nicht.

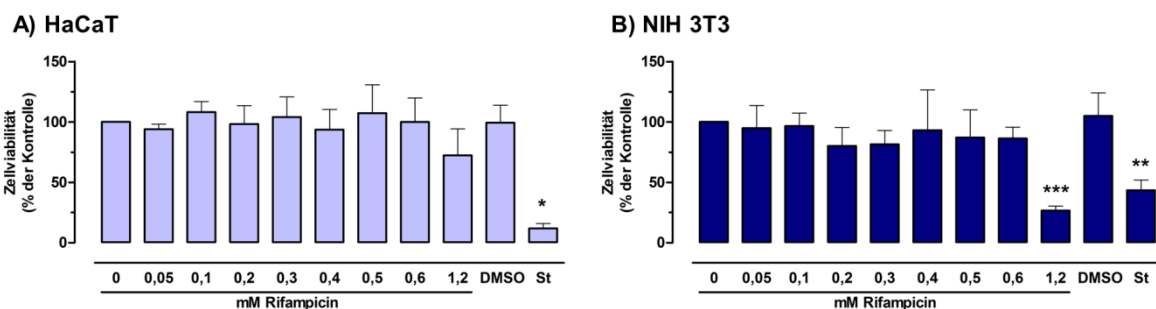


Abbildung 15: Zellviabilität von HaCaT und NIH 3T3 nach 2-stündiger Rifampicinbehandlung.

A) HaCaT Keratinozyten und B) NIH 3T3 Fibroblasten wurden für 2 h mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen (0-1,2 mM), Lösungsmittelkontrolle (DMSO) oder 1 μ M Staurosporin (St, positiv Kontrolle) behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1 Reagenz. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 5). *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 wurden als statistisch signifikant zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle (0 mM Rifampicin) angesehen.

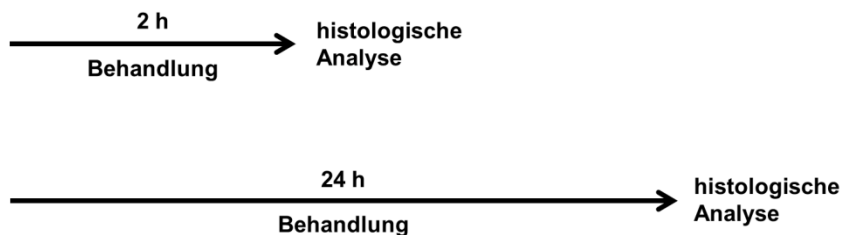
Versuchsaufbau in primären Fibroblasten:



Da eine 2-stündige Behandlung von NIH 3T3 Fibroblasten mit 1,2 mM Rifampicin zu einer verringerten Zellviabilität führte, wurden außerdem primäre Fibroblasten aus nicht entzündlicher Haut von Brustreduktionen mit unterschiedlichen Rifampicinkonzentrationen über einen Zeitraum von 2 h behandelt. Die 2-stündige Behandlung mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen zeigte keinen Anstieg der *cleaved Caspase 3*-Proteinexpression im Vergleich zur Positivkontrolle (s. Anhang Abbildung 32), wodurch eine Induktion der Apoptose durch die Rifampicinbehandlung ausgeschlossen werden konnte.

3.2.1.2 Toxizität einer Rifampicinbehandlung in *ex vivo* Explantaten

Versuchsaufbau in *ex vivo* Explantaten:



Für die Untersuchungen zum Einfluss der *in vitro* Rifampicinbehandlung auf morphologische Veränderungen in den *ex vivo* Explantaten, wurden die Explantate für 2 h und 24 h mit Rifampicin im Kulturmedium behandelt. Aus der Hämatoxylin-Eosin Färbung geht hervor, dass eine Behandlung der *ex vivo* Explantate aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa* während der Kultivierung bis 24 h keinen Einfluss auf die Morphologie der Explantate hatte. Die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) zeigte dabei keine Effekte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Die Hämatoxylin-Eosin Färbungen sind im Anhang abgebildet (Abbildung 33).

Um beurteilen zu können, ob die Rifampicinbehandlung der *ex vivo* Explantate aus nicht entzündlicher Haut von Brustreduktionen und *Hidradenitis suppurativa* die Proliferation der Keratinozyten in der Epidermis beeinflusst, wurden diese mit dem Proliferationsmarker Ki-67 immunohistologisch gefärbt. Die Proliferationsrate der Keratinozyten in den Explantaten aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa* blieb während der verschiedenen Behandlungszeiträume unverändert. Die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) zeigte dabei keine Effekte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Die immunhistochemischen Färbungen sind im Anhang abgebildet (Abbildung 34).

Als Marker für die frühe Apoptoseinduktion wurde hier *cleaved Caspase 3* genutzt, wobei zwischen epidermaler und dermaler Apoptoseinduktion unterschieden wurde. Der immunhistologische Nachweis zeigte keine *cleaved Caspase 3(+)* Keratinozyten nach einer 2-stündigen Rifampicinbehandlung in nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa* Explantaten. Die histologische Analyse der über 24 h behandelten Explantate bestätigte ebenfalls keinen Anstieg von *cleaved Caspase 3(+)* Zellen und damit keine Apoptoseinduktion durch die Rifampicinbehandlung (Abbildung 35 im Anhang). Im immunhistologischen Nachweis zeigten sich gleichermaßen keine *cleaved Caspase 3(+)* Zellen in der Dermis der über 2 h mit Rifampicin behandelten Explantate aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa*. Auch in den Explantaten, die 24 h mit Rifampicin behandelt wurden, wies die histologische Analyse keine vermehrten *cleaved Caspase 3(+)* Zellen in der Dermis nach der 24-stündigen Rifampicinbehandlung auf (Abbildung 36 im Anhang). Die Lösungsmittelkontrollen (DMSO) zeigte keine Effekte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

3.2.2 Immunmodulierende Wirkung einer Rifampicinbehandlung

Für die Beurteilung des Einflusses von Rifampicin in inflammatorischen Prozessen in *Hidradenitis suppurativa*, wurden der TLR2-Signalweg, Zytokinausschüttung und Immunzellen in unterschiedlichen Zellkulturmodellen untersucht.

3.2.2.1 Immunmodulierende Wirkung einer Rifampicinbehandlung in Monolayern mit primären Zellen

Versuchsaufbau TLR2 in Monolayer:



Da der TLR2 von epidermalen und dermalen Zellen exprimiert wird, wurden primäre Keratinozyten und Fibroblasten über einen Zeitraum von 24 h mit verschiedenen Zytokin-Mixen und LPS vorstimuliert, anschließend mit 1,2 mM Rifampicin für 2 h behandelt und die TLR2-Proteinexpression bestimmt. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich wird, hatte eine

Stimulation mit Rifampicin unter inflammatorischen Bedingungen keinen Einfluss auf die TLR2-Proteinexpression auf A) Keratinozyten sowie B) Fibroblasten aus nicht entzündlicher Haut aus Brustreduktion.

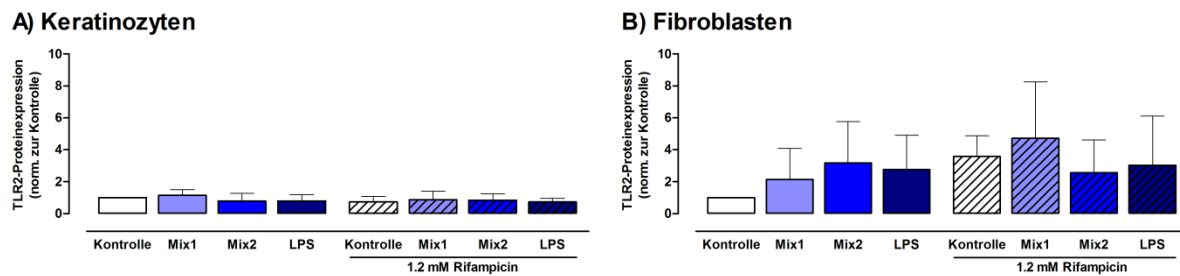
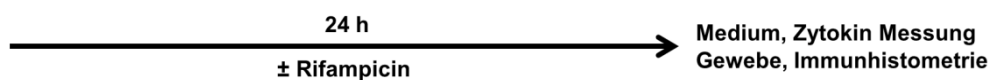


Abbildung 16: Wirkung einer Rifampicinbehandlung unter proinflammatorischen Bedingungen auf die Toll-like Rezeptor 2-Proteinexpression.

A) Keratinozyten und B) Fibroblasten aus nicht entzündlicher Haut wurden über einen Zeitraum von 24 h mit dem Mix 1 (20 ng/mL Interleukin-1 β und Interleukin-17A), dem Mix 2 (20 ng/mL Interleukin-1 β , Interleukin-6, Interleukin-12, Interleukin-17A, Interleukin-22, Interleukin-23, Tumornekrose Faktor), 10 μ g/mL Lipopolysaccharide (LPS) oder unbehandelt (Kontrolle) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h weiter ohne Behandlung oder mit 1,2 mM Rifampicin weiter inkubiert. Die Lysate wurden für die Analyse der Proteinexpression mit spezifischen Antikörpern gegen den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und β -Aktin inkubiert. Angegeben sind die normierten Mittelwerte bezogen auf die Kontrolle \pm Standardabweichung (Keratinozyten n = 3; Fibroblasten n = 2).

3.2.2.2 Immunmodulierende Wirkung einer Rifampicinbehandlung in ex vivo Explantaten

Versuchsaufbau zum Einfluss einer *in vitro* Rifampicinbehandlung auf Zytokine in ex vivo Explantaten aus *Hidradenitis suppurativa*:



Um den Einfluss von Rifampicin auf inflammatorische Prozesse zu untersuchen, wurde in dem Medium der mit Rifampicin behandelten *ex vivo* Explantate die Ausschüttung von *Hidradenitis suppurativa*-assoziierten Zytokinen gemessen. Die Messung mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* ergab, dass eine Behandlung der Explantate mit 1,2 mM Rifampicin zu einer signifikant verminderten Ausschüttung von TNF- α und IL-1 β führt, während die Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) **keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion hatte (Abbildung 17).

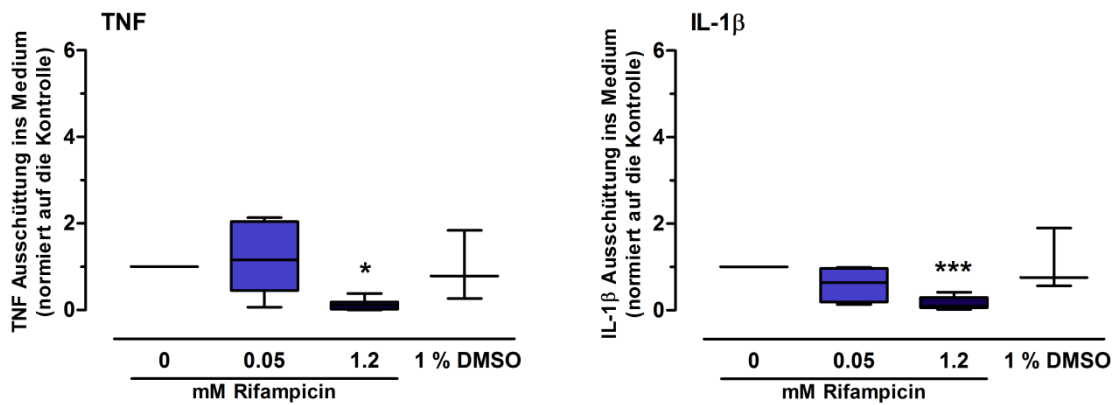


Abbildung 17: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf die Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 β Ausschüttung von *ex vivo* Explantaten gemessen mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*.

Die Explantate wurden für 24 h mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. In dem Medium wurden die Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β)-Konzentrationen mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle (0 mM Rifampicin) normiert und sind dargestellt als Whisker Boxplot (0-1.2 mM Rifampicin n = 6, 1 % DMSO n = 3). Die P-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem anschließenden *Dunn's multiple comparison* berechnet. *p < 0,05 und ***p < 0,001 wurden als signifikant zur Kontrolle (0 mM Rifampicin) gesehen. (modifiziert nach Haferland *et al.* 2022)

Außerdem konnte eine signifikante Reduktion der TNF und IL-1 β Level im Medium nach einer Behandlung mit 1,2 mM Rifampicin auch mit der Messung über den *Cytometric Bead Assay* gezeigt werden (Abbildung 18).

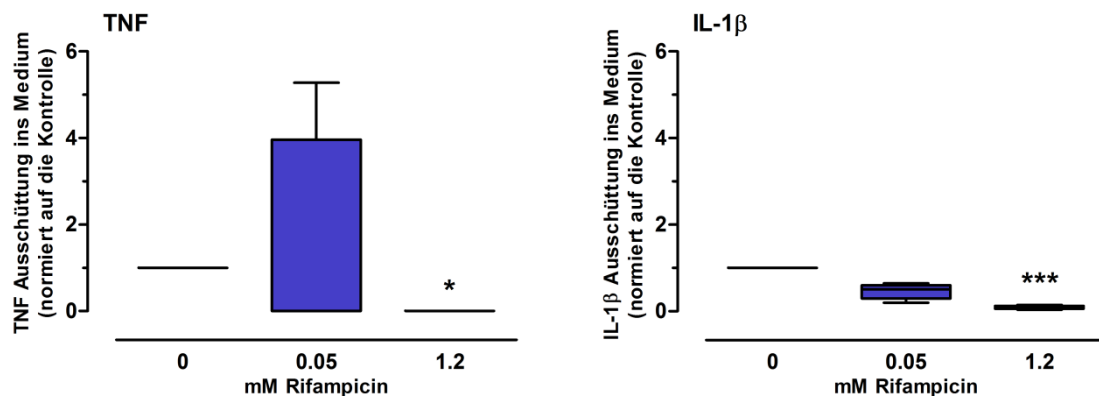


Abbildung 18: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf die Tumornekrosefaktor und Interleukin-1 β Ausschüttung von *ex vivo* Explantaten gemessen mittels *Cytometric Bead Assay*.

Die Explantate wurden für 24 h mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen kultiviert. In dem Medium wurden die Tumornekrosefaktor (TNF)- und Interleukin-1 β (IL-1 β)-Konzentrationen mittels *Cytometric Bead Assay* gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle (0 mM Rifampicin) normiert und sind dargestellt als Whisker Boxplot (TNF n = 4; IL-1 β n = 5). Die P-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem anschließenden *Dunn's multiple comparison* berechnet. *p < 0,05 und ***p < 0,001 wurden als signifikant zur Kontrolle (0 mM Rifampicin) gesehen. (modifiziert nach Haferland *et al.* 2022)

Neben der TNF und IL-1 β Sekretion wurden weitere Zytokine und Chemokine mit Hilfe des *Cytometric Bead Assays* im Medium der über 24 h mit Rifampicin behandelten Explantate gemessen. Die Behandlung mit 1,2 mM Rifampicin führte zu einer signifikant verringerten Ausschüttung des proinflammatorischen IL-6 und IL-8 sowie des antiinflammatorischen IL-10 (Abbildung 19). Die Zytokine IL-2, IL-4, IL-12/IL23p40, IL-13, IL-17A sowie IL-17F waren im Medium der Kontrolle und behandelten Explantate nicht nachweisbar.

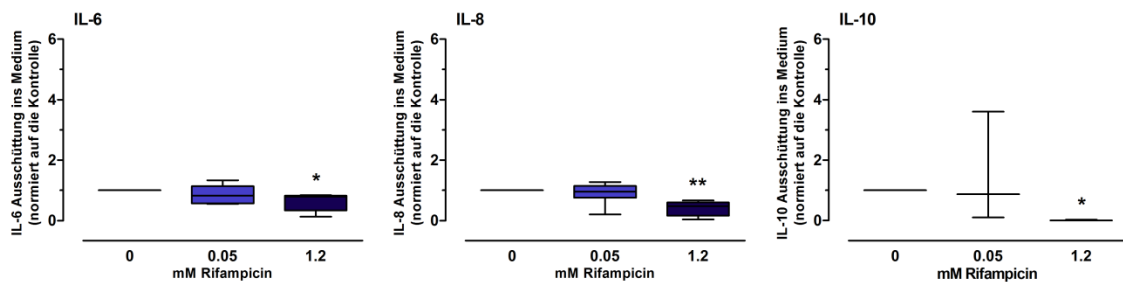


Abbildung 19: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf die Interleukin-6, Interleukin-8 und Interleukin-10 Ausschüttung von *ex vivo* Explantaten.

Die Explantate wurden für 24 h mit verschiedenen Rifampicin-Konzentrationen kultiviert. In dem Medium wurden die Interleukin-6 (IL-6)-, Interleukin-8 (IL-8)- und Interleukin-10 (IL-10)-Konzentrationen mittels *Cytometric Bead Assay* gemessen. Die Werte wurden auf die Kontrolle (0 mM Rifampicin) normiert und sind dargestellt als Whisker Boxplot (IL-6 n = 6; IL-8 n = 6; IL-10 n = 3). Die P-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem anschließenden *Dunn's multiple comparison* berechnet. *p < 0,05 und **p < 0,01 wurden als signifikant zur Kontrolle (0 mM Rifampicin) gesehen. (modifiziert nach Haferland *et al.* 2022)

Außerdem wurden Schnitte der *ex vivo* Explantate, bei denen die Zytokine im Medium nach der Rifampicinbehandlung reduziert gemessen wurden, immunhistologisch analysiert. Die Quantifizierung zeigte tendenziell verminderte TNF- α (+) und IL-1 β (+) Zellen in den Rifampicin behandelten Explantaten. Die Behandlung der *ex vivo* Explantate mit 1,2 mM Rifampicin führte zu einer signifikanten Reduktion von IL-8(+) Zellen (Abbildung 20).

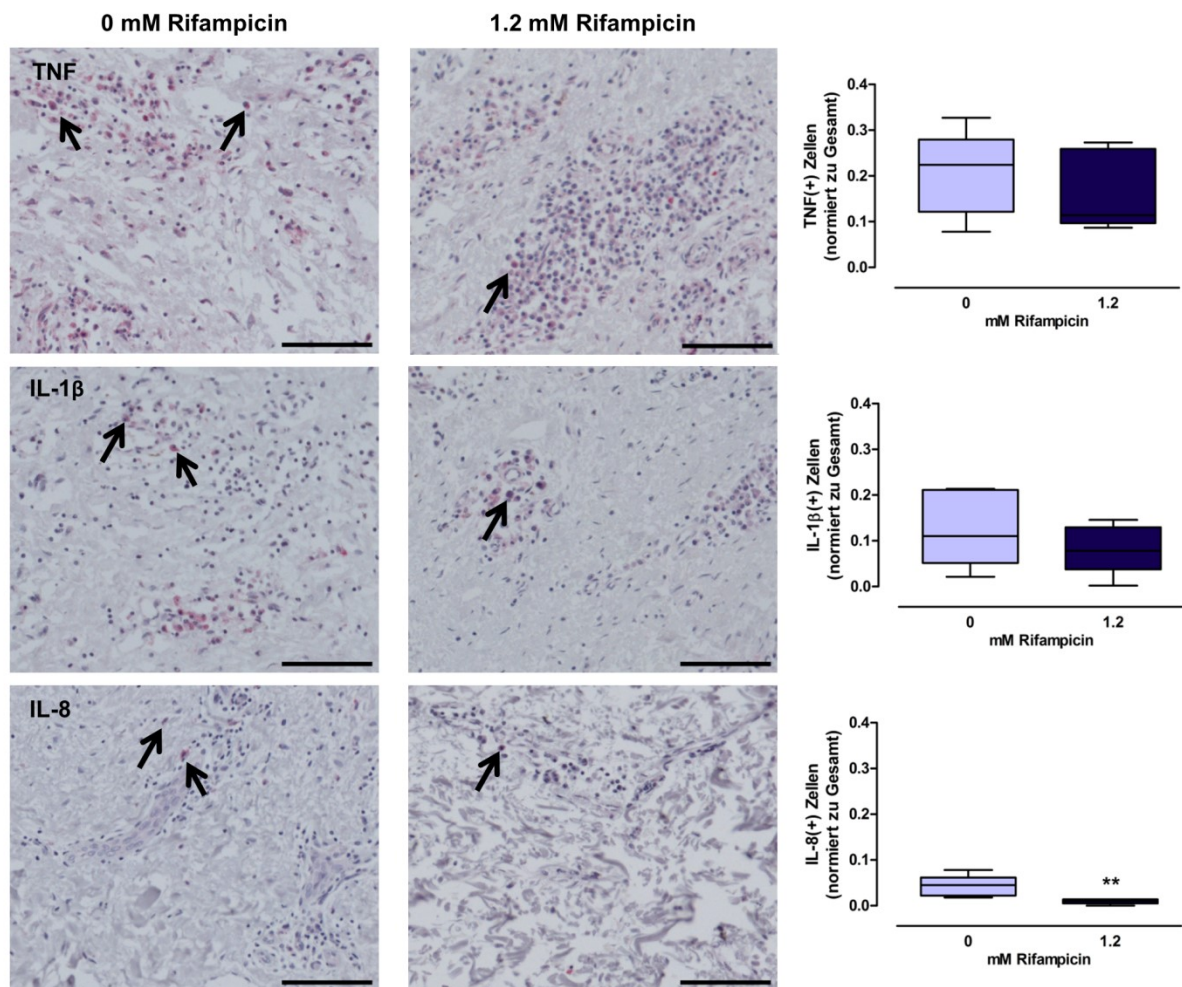
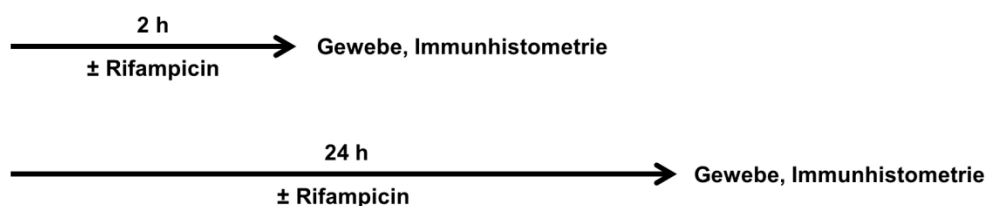


Abbildung 20: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf Tumornekrosefaktor- α (+), Interleukin-1 β (+) und Interleukin-8(+)-Zellen im Stratum papillare der Dermis von *ex vivo* Explantaten.

Für die Beurteilung der Wirkung von Rifampicin auf Zytokin produzierende Zellen in *Hidradenitis suppurativa* Explantaten wurden diese immunohistologisch mit einem Anti-Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)-, Anti-Interleukin-1 β (IL-1 β)- und Anti-Interleukin-8 (IL-8)-Antikörper gefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (TNF n = 5; IL-1 β n = 5; IL-8 n = 5; Maßstabsbalken = 100 μ m; schwarze Pfeile = TNF(+), IL-1 β (+) und IL-8(+)-Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. **p < 0,01 wurde als signifikant zur Kontrolle (0 mM Rifampicin) gesehen. (Haferland *et al.* 2022, Zustimmung der Co-Autoren wurde eingeholt)

Versuchsaufbau zum Einfluss einer *in vitro* Rifampicinbehandlung auf Immunzellen in *ex vivo* Explantaten aus *Hidradenitis suppurativa*:



Da Effekte von Rifampicin auf Immunzellen bereits zuvor mit Hilfe der Immunhistochemie gezeigt wurden, sollte untersucht werden, ob Rifampicin auch Einfluss auf die Anzahl dieser Zellen hat. Die Quantifizierung der CD3(+)-T-Zellen zeigte nach 2- und 24-stündiger Rifampicinbehandlung keine signifikanten Effekte auf die Anzahl der CD3(+)-T-Zellen. Die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) zeigte dabei keine Effekte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 21).

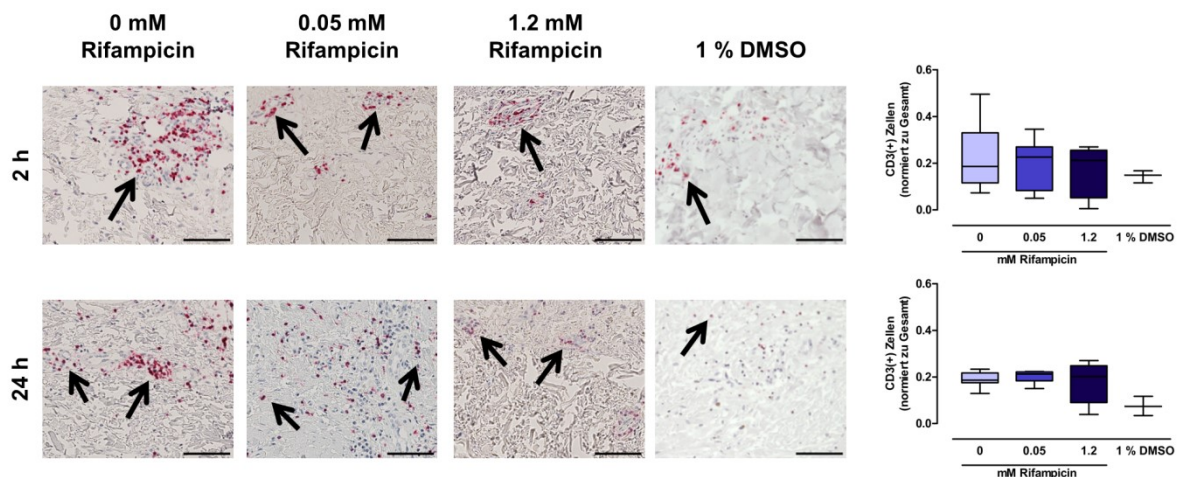


Abbildung 21: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf CD3(+)-T-Zellen im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. Für die Beurteilung der Wirkung von Rifampicin wurden Schnitte dieser mit einem Anti-CD3 Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (0-1.2 mM Rifampicin n = 7, 1 % DMSO n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm; schwarze Pfeile = CD3(+)-T-Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. (modifiziert nach Haferland *et al.* 2022)

Im Zusammenhang mit den T-Zellen war weiterhin interessant, ob eine Rifampicinbehandlung einen Einfluss auf die CD4(+)-T-Zellen ausübt. Die Quantifizierung der Färbung zeigte, dass eine Behandlung mit Rifampicin über 2 h keinen Einfluss auf die Anzahl der CD4(+)-T-Zellen hatte. Die Rifampicinbehandlung über einen Zeitraum von 24 h reduzierte die Anzahl CD4(+)-T-Zellen im *Stratum papillare* der Explantate signifikant. Die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) zeigte dabei keine Effekte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 22).

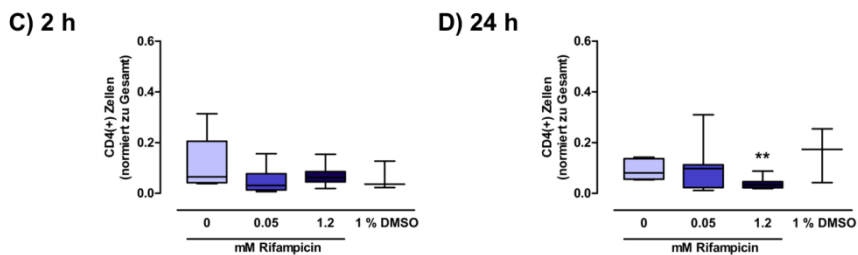
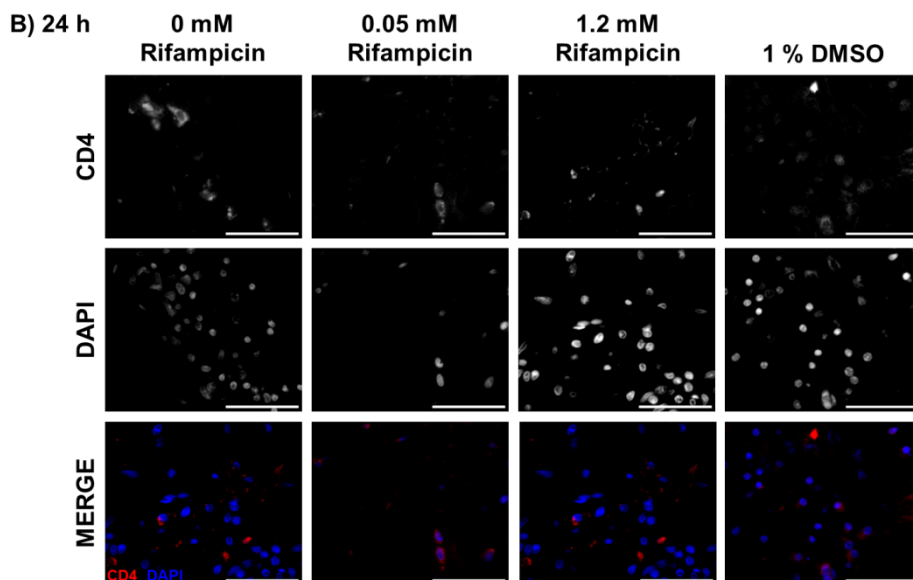
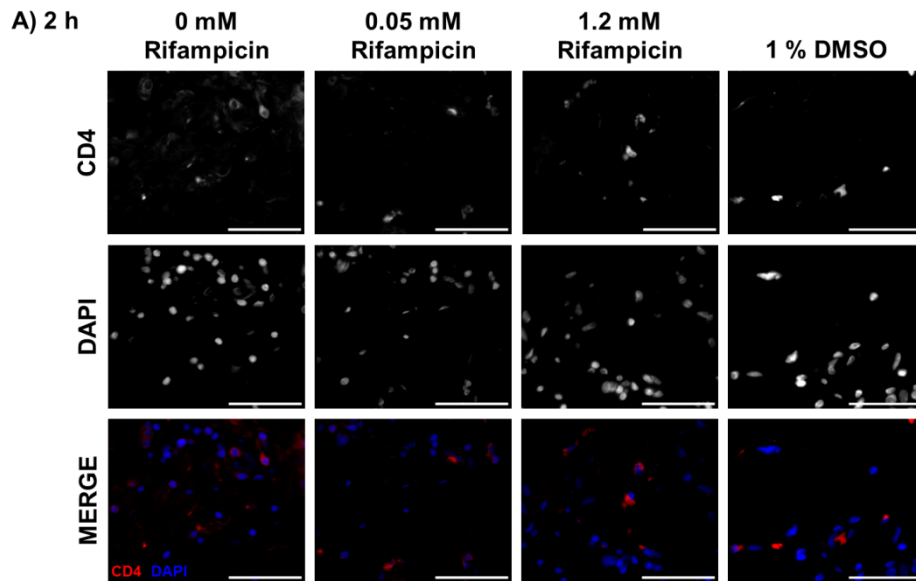


Abbildung 22: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf CD4(+)-T-Zellen im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. Für die Beurteilung der Wirkung von Rifampicin wurden Schnitte dieser mit einem Anti-CD4 Antikörper fluoreszenzmarkiert. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (0-1.2 mM Rifampicin n = 7, 1 % DMSO n = 3; Maßstabsbalken = 50 µm). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. **p < 0,01 wurden als signifikant zur Kontrolle (0 mM Rifampicin) gesehen.

Neben dem Einfluss von Rifampicin auf die Anzahl der T-Zellen wurde der Einfluss auf die in *Hidradenitis suppurativa* erhöht beschriebenen neutrophile Granulozyten untersucht. Dafür wurde die Myeloperoxidase als Zellmarker genutzt. Sowohl eine 2- als auch eine 24-stündige Behandlung mit Rifampicin hatte keinen Einfluss auf die Anzahl Myeloperoxidase(+) Zellen. Die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) zeigte dabei keine Effekte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 23).

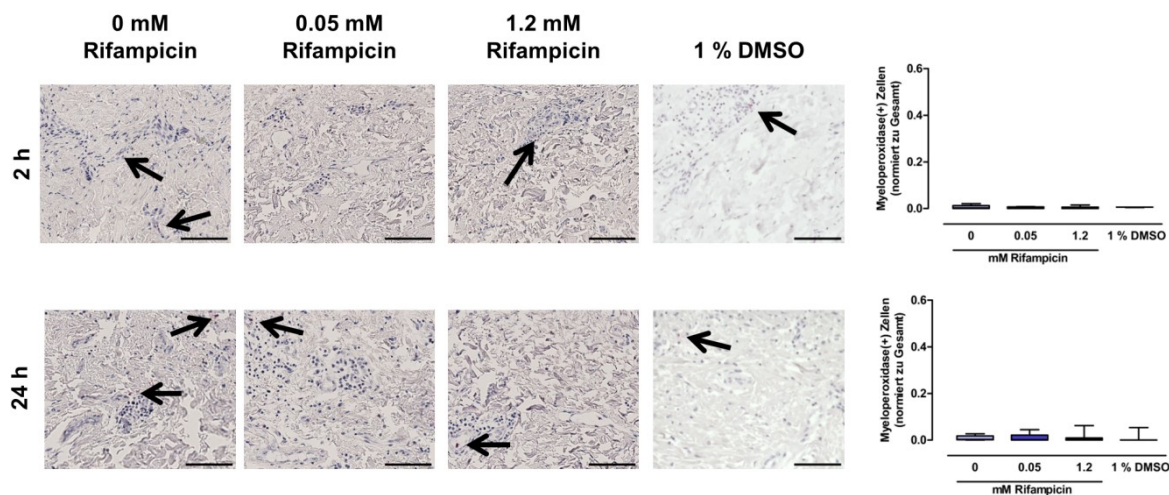


Abbildung 23: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf neutrophile Granulozyten im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. Für die Beurteilung der Wirkung von Rifampicin wurden Schnitte dieser mit einem Anti-Myeloperoxidase-Antikörper (Marker für neutrophile Granulozyten) angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (0-1.2 mM Rifampicin n = 7, 1 % DMSO n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm; schwarze Pfeile = Myeloperoxidase(+) Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. (modifiziert nach Haferland *et al.* 2022)

Weiterhin wurde untersucht, ob die entzündungshemmende Wirkung auf die Zytokinfreisetzung in *Hidradenitis suppurativa* Explantaten nach einer Rifampicinbehandlung auf den TLR2-Signalweg zurückzuführen ist. Da der TLR2 sowohl von Keratinozyten als auch von Fibroblasten und Immunzellen exprimiert wird, wurde zwischen epidermaler und dermaler TLR2-Expression unterschieden. Die immunhistologische Färbung zeigte keinen Unterschied in der epidermalen TLR2 Intensität der mit Rifampicin behandelten *ex vivo* Explantaten nach 2 und 24 h (Abbildung 37 im Anhang). Die Rifampicinbehandlung für 2 h führte zu einer tendenziell verringerten Anzahl der TLR2(+)-Zellen im *Stratum papillare* der Dermis. Dieser Trend setzte sich auch bei einer längeren Kultivierung von 24 h fort. Die

Lösungsmittelkontrolle (DMSO) zeigte dabei keine Effekte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 24).

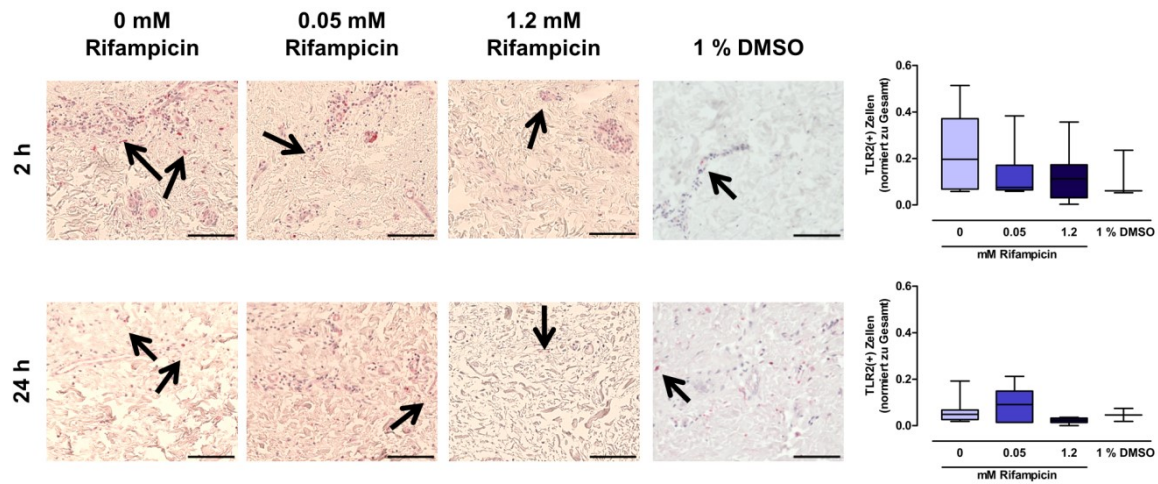


Abbildung 24: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf Toll-like Rezeptor 2(+) Zellen im Stratum papillare der Dermis in ex vivo Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. Für die Beurteilung der Wirkung von Rifampicin wurden Schnitte dieser mit einem Anti-Toll-like Rezeptor 2 (TLR2)-Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (0-1.2 mM Rifampicin n = 7, 1 % DMSO n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm; schwarze Pfeile = TLR2(+) Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. (modifiziert nach Haferland *et al.* 2022)

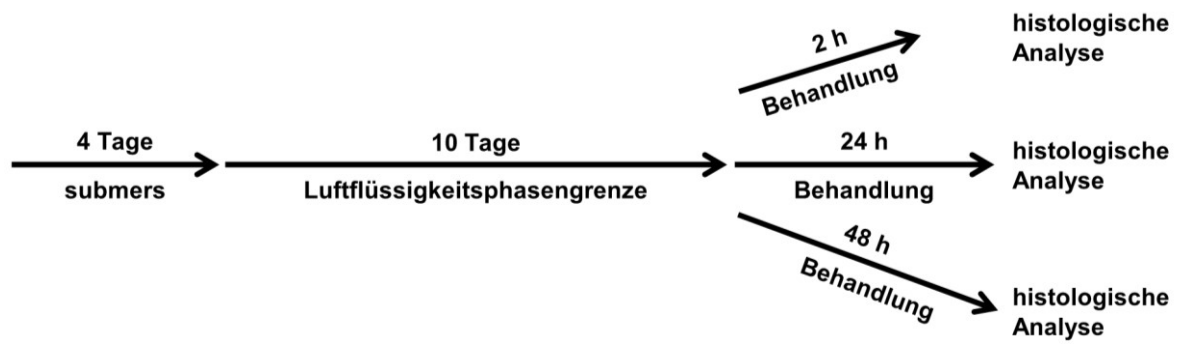
3.3 Behandlungen mit der Rifampicin-Nanoformulierung

Neben der molekularen Wirkung einer *in vitro* Rifampicinbehandlung in *Hidradenitis suppurativa* Zellkulturmodellen, wurde die vom Institut für Pharmazeutische Technologie der Goethe Universität Frankfurt entwickelte Rifampicin-Nanoformulierung präklinisch validiert, um diese dahingehend zu prüfen, ob sie sich als zukünftige topische Anwendung für die milde Form der *Hidradenitis suppurativa* eignet.

3.3.1 Toxizität der Rifampicin-Nanoformulierung

3.3.1.1 Toxizität der Rifampicin-Nanoformulierung in Epidermismodellen

Versuchsaufbau Epidermismodell:



Die Behandlung erfolgte mit einer 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung für 2, 24 und 48 h, wobei bei letzterem nach 24 h eine erneute Behandlung stattfand. Als Kontrolle wurden die Modelle mit unbeladenen Liposomen behandelt. Eine 2-stündige Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Morphologie der Epidermismodelle, während nach 24 h und 48 h das *Stratum corneum* verdickt war (Abbildung 25). Die anderen Zellschichten sahen unauffällig aus.

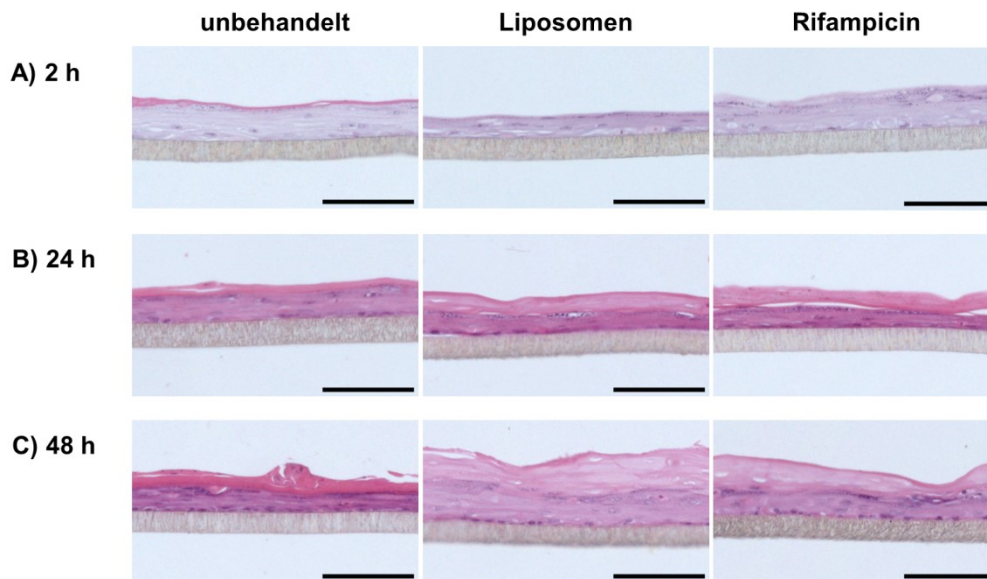


Abbildung 25: Kultivierungseinfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Morphologie von Epidermismodellen.

Epidermismodelle aus *präputialen* Keratinozyten wurden für A) 2, B) 24 und C) 48 h mit unbeladenen Liposomen oder der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Nach der Kultivierung wurden die Epidermismodelle für die morphologische Beurteilung mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Abgebildet sind repräsentative Schnitte (n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm).

Um den Einfluss der Nanoformulierung auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen beurteilen zu können, wurden die behandelten Modelle mit einem Antikörper gegen Ki-67 immunhistologisch gefärbt. Die Behandlung mit der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung führte über einen Zeitraum von 2 bis 24 h zu keiner verminderten Proliferationsfähigkeit. Die Quantifizierung der proliferationsfähigen Keratinozyten nach der 48-stündigen Behandlung deutete auf tendenziell verminderte Anzahl Ki-67(+) Keratinozyten hin. Die immunhistochemischen Färbungen sowie die Quantifizierung sind im Anhang abgebildet (Abbildung 38).

Außerdem wurden die Epidermismodelle mittels *cleaved Caspase 3* Färbung auf Apoptoseinduktion untersucht. Der immunhistologische Nachweis zeigte zu keinem Zeitpunkt *cleaved Caspase 3*(+) Keratinozyten, eine Induktion der Apoptosekaskade durch die Nanoformulierung kann somit ausgeschlossen werden. Die immunhistochemischen Färbungen sind im Anhang abgebildet (Abbildung 39).

In einem weiteren Test für die Beurteilung der Toxizität der Rifampicin-Nanoformulierung, wurden in dem Medium der Epidermismodelle die Laktat-Dehydrogenase Level gemessen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stieg die prozentuale Zytotoxizität durch eine Behandlung mit den unbeladenen Liposomen oder der Rifampicin-Nanoformulierung über 2

bis 48 h nicht. Als Positivkontrolle dienten Epidermismodelle, die mit 1 % Triton behandelt wurden (Abbildung 26).

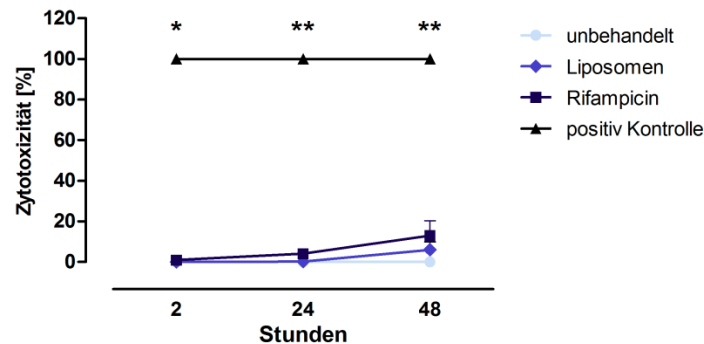


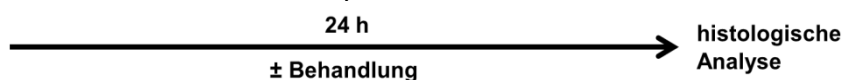
Abbildung 26: Zytotoxizität der Rifampicin-Nanoformulierung auf Epidermismodelle.

Epidermismodelle aus *präputialen* Keratinozyten wurden für 2, 24 und 48 h mit unbeladenen Liposomen, 0,3 %-iger Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) oder 1 %-iger Triton X-100 Lösung (positiv Kontrolle) behandelt. Mit dem Kulturmedium der Modelle wurde ein Laktat-Dehydrogenase Assay durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$). Die P-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem anschließenden *Dunn's multiple comparison* berechnet. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ wurden als statistisch signifikant zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle angesehen.

Neben der Toxizitätsbeurteilung der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung wurden die Epidermismodelle bezüglich Einflüsse der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Differenzierung der Keratinozyten in den Epidermismodellen untersucht. Im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle blieb die Expression der drei Differenzierungsmarkern in den mit der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung behandelten Epidermismodellen innerhalb der Behandlungszeit unverändert (Abbildung 40 im Anhang).

3.3.1.2 Toxizität der Rifampicin-Nanoformulierung in *ex vivo* Explantaten

Versuchsaufbau *ex vivo* Explantate:



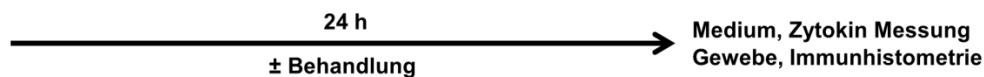
Des Weiteren wurde die Rifampicin-Nanoformulierung auf den *ex vivo* Explantaten aus läSIONALen *Hidradenitis suppurativa* auf toxische Einflüsse getestet. Die Explantate wurden über 24 h kultiviert und verliehen unbelandelt oder wurden entweder mit den unbeladenen Liposomen oder der Rifampicin-Nanoformulierung behandelt. Für die Beurteilung des Einflusses der Behandlungen auf die Morphologie, wurden Schnitte der Explantate nach der Kultivierung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Diese Färbung deutet auf keine morphologische Veränderung der Explantate durch die Behandlung hin (Abbildung 41 im Anhang).

Auch die mit der Rifampicin-Nanoformulierung behandelten Explantate wurden dahingehend untersucht, ob die Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten während der Behandlung gleich blieb. Hieraus ging hervor, dass die Behandlung mit der Rifampicin-Nanoformulierung zu keiner verminderten Proliferationsfähigkeit führte. Die immunhistochemischen Färbungen sind im Anhang abgebildet (Abbildung 42).

Ferner sollte die Einleitung der Apoptose durch die Behandlung der *ex vivo* Explantate mit der Rifampicin-Nanoformulierung ausgeschlossen werden. Die Quantifizierung der *cleaved Caspase 3(+)* Zellen zeigte sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis keine Apoptoseinduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die immunhistochemischen Färbungen sind im Anhang abgebildet (Abbildung 43).

3.3.2 Immunmodulierende Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung

Versuchsaufbau:



Mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* wurde der Wirksamkeit der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung auf die IL-1 β Sekretion in läsionaler *Hidradenitis suppurativa* untersucht. Die Messung ergab eine verminderte IL-1 β Ausschüttung ins Medium durch die Behandlung der läsionalen *Hidradenitis suppurativa* Explantate mit 0,3 %-iger Rifampicin-Nanoformulierung nach 24 h (Abbildung 27).

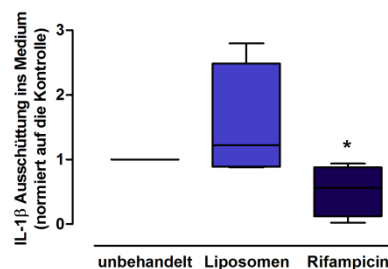


Abbildung 27: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Interleukin-1 β Ausschüttung von *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden für 24 h mit unbeladenen Liposomen oder 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Mit dem Kulturmedium wurde ein IL-1 β *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* durchgeführt. Die Werte wurden auf die Kontrolle (unbehandelt) normiert und sind dargestellt als Whisker Boxplot (n = 4). Die P-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem anschließenden *Dunn's multiple comparison* berechnet. *p < 0,05 wurde als statistisch signifikant zur unbehandelten Kontrolle angesehen.

In den mit der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung behandelten *ex vivo* Explantaten wurden schließlich der Effekt auf die Immunzellen untersucht. Die Quantifizierung der CD3(+)-T-Zellen zeigte nach 24-stündiger Rifampicin-Nanoformulierung Behandlung keinen Einfluss auf die Anzahl der CD3(+)-T-Zellen (Abbildung 28).

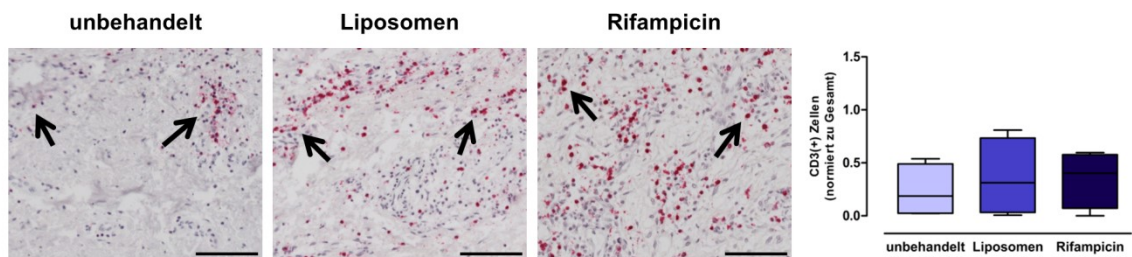


Abbildung 28: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf CD3(+)-T-Zellen im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden für 24 h mit unbeladenen Liposomen oder 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Für die Beurteilung der Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung wurden Schnitte dieser mit einem Anti-CD3 Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (n = 4; Maßstabsbalken = 100 µm; schwarze Pfeile = CD3(+)-T-Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Als nächstes wurden die T-Zellen differenzierter untersucht. Die Quantifizierung der mittels Immunfluoreszenz markierten CD4(+)-T-Zellen konnte keinen Effekt auf die CD4(+)-T-Zellen in den Explantaten durch die 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisen (Abbildung 29).

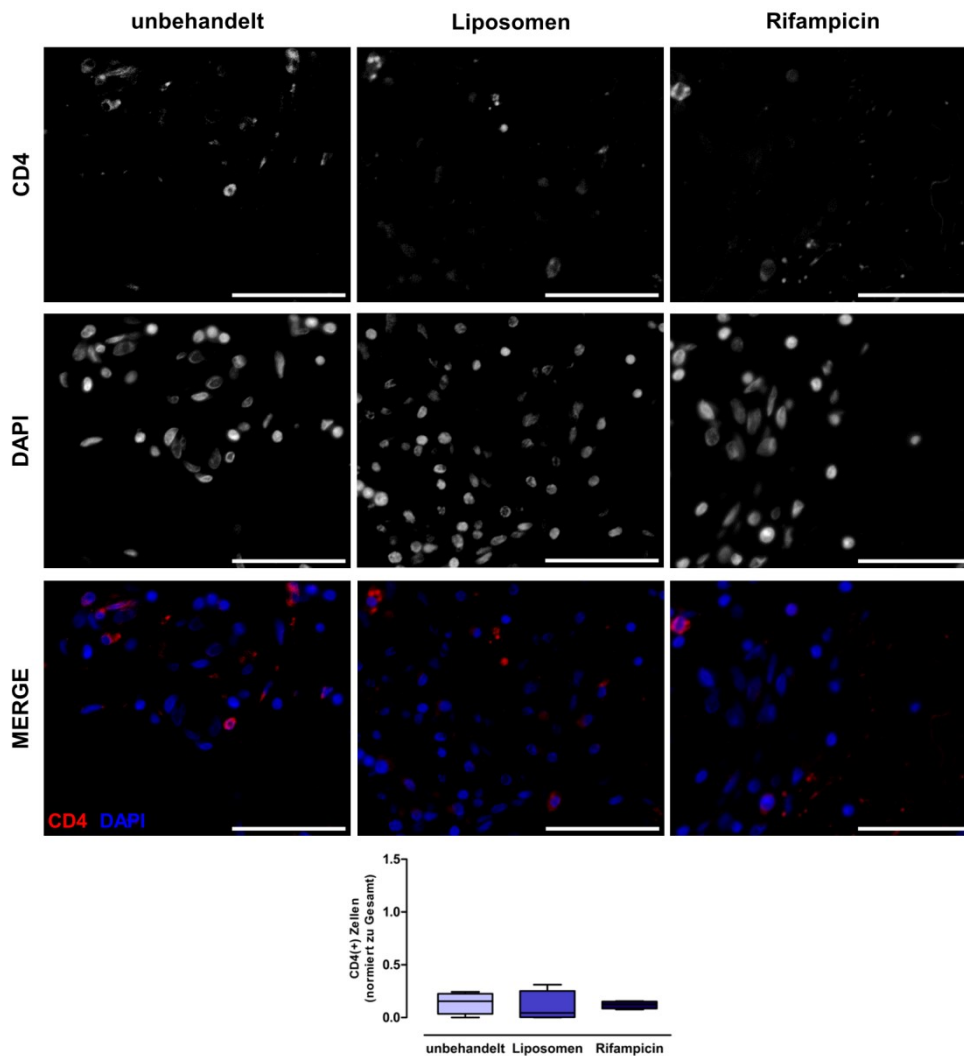


Abbildung 29: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf CD4(+)-T-Zellen im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden für 24 h mit unbeladenen Liposomen oder 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Für die Beurteilung der Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung wurden Schnitte dieser mit einem Anti-CD4 Antikörper fluoreszenz markiert. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (n = 4; Maßstabsbalken = 50 μ m). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Zudem wurde der Einfluss der Behandlung auf die Anzahl neutrophilen Granulozyten untersucht. Hierbei konnte kein Effekt auf die Anzahl der neutrophilen Granulozyten durch die Behandlung mit 0,3 %-iger Rifampicin-Nanoformulierung über 24 h nachgewiesen werden (Abbildung 30).

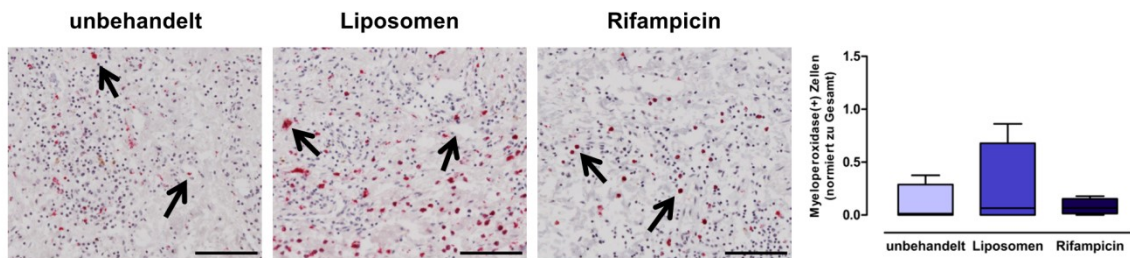


Abbildung 30: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf neutrophile Granulozyten im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden für 24 h mit unbeladenen Liposomen oder 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Für die Beurteilung der Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung wurden Schnitte dieser mit einem Anti-Myeloperoxidase-Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (n = 4; Maßstabsbalken = 100 µm schwarze Pfeile = Myeloperoxidase(+) Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Nachdem sich bereits eine tendenziell verringerte Anzahl TLR2(+) Zellen im *Stratum papillare* bei den mit 1,2 mM Rifampicin in DMSO behandelten *ex vivo* Explantate abzeichnete, sollten auch die mit der Rifampicin-Nanoformulierung behandelten Explantate dahingehend untersucht werden. Die immunhistologische Färbung deutet auf keinen Unterschied in der epidermalen TLR2 Intensität der mit Rifampicin-Nanoformulierung behandelten *ex vivo* Explantaten hin (Abbildung 44 im Anhang). Die Quantifizierung der TLR2(+) Zellen im *Stratum papillare* der Dermis zeigte dabei einen schwachen Trend zu verminderten TLR2(+) Zellen (Abbildung 31).

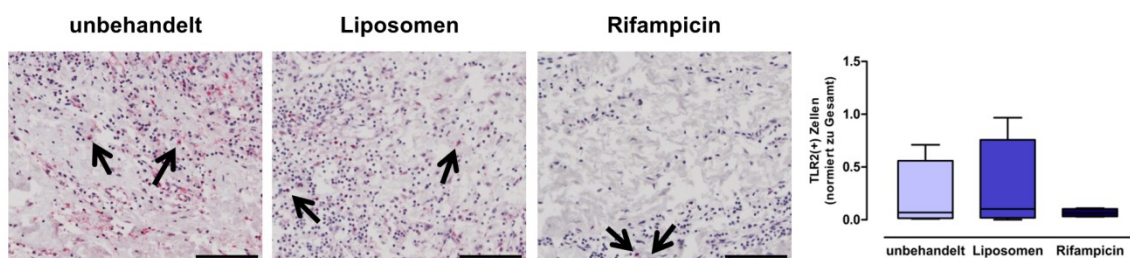


Abbildung 31: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf Toll-like Rezeptor 2(+) Zellen im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden für 24 h mit unbeladenen Liposomen oder 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Für die Beurteilung der Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung wurden Schnitte dieser mit einem Anti-Toll-like Rezeptor 2 (TLR2)-Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (n = 4; Maßstabsbalken = 100 µm; schwarze Pfeile = Toll-like Rezeptor 2(+) Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst *Hidradenitis suppurativa* Zellkulturmodelle etabliert werden, welche im Folgenden für die Untersuchung der Wirkung sowie zur Validierung der vom Institut für Pharmazeutische Technologie der Goethe Universität Frankfurt 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung genutzt werden sollten. Die Untersuchung der Wirkung diene der Suche von Biomarkern für die Wirksamkeit der Rifampicin-Nanoformulierung bei *Hidradenitis suppurativa* und gleichzeitig der Erforschung der immunmodulierenden Wirkung in *Hidradenitis suppurativa*-typische Proteine und Zellen.

4.1 Etablierung von *Hidradenitis suppurativa* Zellkulturmodellen

4.1.1 *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle

Als erstes Ziel dieser Arbeit wurden *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle etabliert. Diese sollten dabei die gleichen Eigenschaften aufweisen, wie die in der Literatur bereits beschriebene Epidermis der *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten. Ein Vergleich zwischen Epidermismodellen aus *Präputium* und *Hidradenitis suppurativa* sowie den entsprechenden Biopsien erlaubte eine Aussage darüber, ob die Epidermismodelle der nativen Epidermis entsprachen. Dafür wurden die Morphologie mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung und die Differenzierung der Keratinozyten durch die Färbung mit entsprechenden Markern untersucht, um beurteilen zu können, ob die funktionellen Schichten der Epidermis ausgebildet wurden. Da die Erkrankung zumeist in der dritten und vierten Lebensdekade der Patientinnen und Patienten ihren Aktivitätshöhepunkt erreicht (22–24), handelt es sich um adulte Keratinozyten, die für die Kultivierung der *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle genutzt wurden. Adulte Keratinozyten gelten als weniger proliferativ als juvenile Keratinozyten (157), etwa denen aus *Präputium*, welche von Spendern aus dem Kindesalter stammten. Ein Protokoll für die Kultivierung von Epidermismodellen aus *präputialen* Keratinozyten lag bereits vor, welches vorsah, nach 4 Tagen submerser Kultivierung, eine 10-tägige Kultivierung an der Luftflüssigkeitsphasengrenze anzuschließen. (180) Der Kultivierungszeitraum der Epidermismodelle an der Luftflüssigkeitsphasengrenze wurde daher gemäß dem Protokoll von Jean *et al.* 2009 von 10 auf 14 und 21 Tage verlängert, um so möglichen Proliferationseinschränkungen der adulten Keratinozyten aus *Hidradenitis suppurativa* vorzubeugen. (181) Die hier genutzten Keratinozyten aus läsionaler *Hidradenitis suppurativa* bildeten mehrschichtige Epidermismodelle. Aus histologischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Epidermis bei *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten vermehrt Reteleisten und eine psoriasiforme Hyperplasie im Vergleich zu nicht entzündlicher

Haut ausbildet. (182–185) Diese morphologischen Eigenschaften konnten die immunhistochemischen Färbungen der Biopsien bestätigen, jedoch ließen sie sich in den Epidermismodellen nicht reproduzieren. Dies lässt sich durch die Verwendung der starren Transwellsysteme für die Kultivierung der Epidermismodelle erklären. Die Ausbildung von Reteleisten ist somit nur in Vollhautmodellen zu erwarten. Nach 21 Tagen Kultivierung an der Luftflüssigkeitsphasengrenze, konnte sowohl in den Epidermismodellen aus *Hidradenitis suppurativa* als auch *Präputium* ein verdicktes *Stratum corneum* im Vergleich zu den 14 Tagen Kultivierung beobachtet werden, was auf eine erhöhte Proliferation hindeutet. Vor dem Hintergrund, dass die Epidermis sich ständig selbsterneuert, könnte der Grund des verdickten *Stratum corneums* auch in der längeren Kultivierungszeit liegen, so dass mehr Zeit für die Ausbildung des *Stratum corneum* verliert. Als wichtiger Bestandteil des Verhornungsprozesses, trägt Filaggrin wesentlich zur Stratifizierung der Epidermis bei. (185) Die in *Hidradenitis suppurativa* beschriebene und auch hier bestätigte verminderte Filaggrin Intensität in den Biopsien aus *Hidradenitis suppurativa* im Vergleich zu nicht entzündlicher Haut (172,185), zeichnete sich auch in den immunhistologischen Nachweisen der Epidermismodellen für beide Kultivierungszeiträume ab, wenn auch die Quantifizierung dies nicht belegen konnte. Ein weiteres Protein, welches sich an den initialen Schritten des Verhornungsprozesses beteiligt, ist Involucrin. (186) Die *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle zeigten eine verstärkte Involucrin Verteilung im Vergleich zu den Epidermismodellen aus *Präputium*. Diesen Effekt demonstrieren auch die Biopsien aus *Hidradenitis suppurativa* und nicht entzündlicher Haut aus Brustreduktion. Im Vergleich zur gesunden Kontrolle, beobachteten Dmitriev *et al.* 2021 ebenfalls eine erhöhte Involucrin Expression in läsionaler *Hidradenitis suppurativa*. (172) Als Marker für die frühe Differenzierung diente Zytokeratin-10 in dieser Arbeit. (187,188) Unabhängig von der Kultivierungsdauer war die Zytokeratin-10 Expression in den Epidermismodellen aus *Präputium* ausgeprägter als in denen aus *Hidradenitis suppurativa*. Gleiches galt für die nicht entzündliche Haut, was die Ergebnisse von Dmitriev *et al.* 2021 bestätigen. Im Gegensatz dazu, zeigten Kurzen *et al.* 1999 und Kurokawa *et al.* 2002 eine starke subbasale Färbung in läsionaler *Hidradenitis suppurativa* Epidermis. Darüber hinaus untersuchten sie die Expression von Zytokeratin-10 in verschiedenen Stadien drainierender Sinustrakte mittels Immunhistochemie. Im verhornten Epithel stellten sie eine stärkere Expression von Zytokeratin-10 fest, die im weniger verhornten und stark entzündeten Epithel abnahm. (188,189) Diese Ergebnisse implizieren, dass die Krankheitsprogression und/oder Entzündung einen Einfluss auf die Keratinozyten Differenzierung hat und somit die Expression von Zytokeratin-10 bei *Hidradenitis suppurativa* im Vergleich zu nicht entzündlicher Haut verringern kann. Zur Beurteilung der Epidermismodelle hinsichtlich

proliferationsfähiger Keratinozyten innerhalb des Modells, wurde in der vorliegenden Arbeit die Ki-67-Färbung verwendet. Die Quantifizierung zeigte diesbezüglich tendenziell mehr Ki-67(+)-Keratinozyten in den Epidermismodellen aus *Hidradenitis suppurativa* im Vergleich zu denen aus *Präputium*, was somit der *in vivo* Situation gleichkommt. Mittels Quantifizierung fanden Dmitriev *et al.* 2021 und van der Zee *et al.* 2012 ebenfalls eine erhöhte Anzahl Ki-67(+) Keratinozyten in entzündlichen Arealen von *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. (172,190) Auch wenn bei der Quantifizierung in den *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodellen im Vergleich zu denen aus *Präputium* lediglich einen Trend zu einer höheren Anzahl von Ki-67(+) Keratinozyten nachgewiesen werden konnte, kann aus den Daten geschlossen werden, dass die Keratinozyten ihre Fähigkeit zur Proliferation während der Kultivierung nicht verlieren. Weiterhin bleibt die bei *Hidradenitis suppurativa* beobachtete gestörte Barrierefunktion der Keratinozyten in den Epidermismodellen tendenziell erhalten. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Trends könnten durch eine Modifikation des Mediums, z.B. durch eine Zugabe von *Hidradenitis suppurativa*-assoziierten Zytokinen oder durch die Erweiterung der Epidermismodelle mit Kokulturen möglicherweise signifikant werden.

In Anbetracht dessen, dass *Hidradenitis suppurativa* eine chronisch entzündliche Hauterkrankung ist, sollte ein Modell für die Forschung die in *Hidradenitis suppurativa* beschriebenen Entzündungsmuster widerspiegeln. Aus der Literatur ist bekannt, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α in hohem Maße in läsionalen Gewebe, im Medium von *ex vivo* kultivierten Explantaten und im Blut von Patientinnen und Patienten nachweisbar sind. (43,44,73,191) Nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen, wiesen die *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle einen Trend zu einer höheren IL-1 β und TNF- α -Sekretionen auf. Der Trend der erhöhten IL-1 β Level war nach 21 Tagen Kultivierung jedoch umgekehrt. Hingegen lag die TNF- α -Ausschüttung sowohl bei den *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodellen als auch bei den *präputialen* Epidermismodellen unterhalb der Nachweisgrenze, was darauf hindeutet, dass sich das Zytokinprofil möglicherweise aufgrund fehlender Stimulation nach 21 Tagen normalisiert und damit die Kultivierungszeit von 21 Tagen zu lang ist.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Keratinozyten aus läsionaler *Hidradenitis suppurativa* mehrschichtige Epidermismodelle bilden können, welche die essentiellen Differenzierungsmarker ähnlich der nativen läsionalen *Hidradenitis suppurativa* exprimieren. Des Weiteren schütten die Epidermismodelle aus *Hidradenitis suppurativa* die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α aus. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle für die Grundlagenforschung, zur

Suche nach möglichen Biomarkern sowie zur Testung von topischen oder systemischen Wirkstoffen, insbesondere für die Validierung der Rifampicin-Nanoformulierung, eignen.

4.1.2 *Ex vivo* Explantate

Darüber hinaus wurden die bereits von anderen Arbeitsgruppen der *Hidradenitis suppurativa* Forschung genutzten *ex vivo* Explantate etabliert. Die Explantatkulturen beinhalten wichtige Charakteristika der nativen Gewebe wie die extrazelluläre Matrix, die Diversität der Zelltypen, natürlich stratifizierte epidermale Schichten sowie die Hautanhangsgebilde, Haarfollikel und Talgdrüseneinheit. (164) Da aktuell davon ausgegangen wird, dass eine Entzündung der Talgdrüseneinheit der Ätiologie der *Hidradenitis suppurativa* entspricht, bildet dieses System die *in vivo* Situation am umfangreichsten ab, mit der Grundlagenforschung betrieben und nach Biomarkern gesucht werden kann. (44,75,154,191–193) In Anlehnung an das Protokoll von *van der Zee et al.* 2011, erfolgte die Etablierung der Explantatkulturen. Die Beurteilung der Morphologie und damit die strukturelle Integrität der läsionalen Epidermis der hier etablierten *ex vivo* Explantate, erfolgte anhand der Hämatoxylin-Eosin Färbung. Im Vergleich zu den direkt fixierten Biopsien, konnte aufgrund der Hämatoxylin-Eosin Färbung kein Einfluss der Kultivierung bis zu 48 h auf die strukturelle Integrität der Epidermis bei den Explantaten aus nicht entzündlicher Haut als auch *Hidradenitis suppurativa* nachgewiesen werden. *Sanchez et al.* 2019 zeigten in ihrer Arbeit Explantatkulturen, deren Hautarchitektur bis zu 4 Tage Kultivierung erhalten blieb. Verglichen mit dem in dieser Arbeit eingesetzten Medium, nutzten sie ein anderes Kultivierungsmedium, was außerdem 10 % fötales Kälberserum enthielt und ersetzten das Medium alle 2 Tage, anstelle eines täglichen Mediumwechsels. (154) Des Weiteren wurde ein *ex vivo* Explantat Modell aus gesunder Haut in Kokultur mit der Sebozyten-Zelllinie SZ95 vorgestellt. Dieses sowie entsprechende Kontrollen wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen in serumfreien Sebozytenmedium kultiviert und das Medium jeden zweiten Tag durch frisches Medium ersetzt. Im zeitlichen Verlauf der Kultivierung (Tag 2, Tag 4, Tag 6) deutete die Hämatoxylin-Eosin Färbung der Explantate mit Sebozyten Koulkultur im Vergleich zu ohne Kokultur auf keine morphologischen Veränderungen hin. Die Modelle ohne Kokultur dagegen, wiesen eine Auflösung der Epidermis auf. (194) In einem nächsten Schritt wurden läsionale sowie periläsionale *Hidradenitis suppurativa* Gewebestücke in Kokultur mit Sebozyten oder alleine über einen Zeitraum von 3 Tagen kultiviert, hierbei erfolgte ein täglicher Mediumwechsel. Die Hämatoxylin-Eosin Färbung demonstrierte bei den Explantaten ohne Kokultur eine sich auflösende Epidermis, während sie bei den Explantaten mit Kokultur unverändert blieb. Die

Autoren führten diesen Effekt darauf zurück, dass die Sebozyten wichtige Komponenten für die Aufrechterhaltung der Vitalität der Explantate bereitstellen. (192) Doch weder die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit noch die Daten von Sanchez *et al.* 2019 konnten die bei Nikolakis *et al.* 2016 und Hou *et al.* 2022 beobachtete Desintegration der Epidermis bei alleiniger Kultivierung der *ex vivo* Explantate zeigen. Neben der Bildung essentieller Faktoren für die Erhaltung der epidermalen Integrität durch die Sebozyten könnte auch das Sebozytenmedium einen Einfluss auf die Explantate ohne Kokulturen haben, was schließlich zur Degeneration der Epidermis führte. Da für die noch folgenden Experimente mit den *ex vivo* Explantaten im Rahmen dieser Arbeit kein längerer Kultivierungszeitraum als 24 h benötigt wurde, war die Kultivierung bis 48 h bei gleichbleibender Morphologie ausreichend. Die Ergebnisse der beschriebenen Untersuchungen mit nicht entzündlichen und entzündlichen *ex vivo* Explantaten deuten darauf hin, dass sich die strukturelle Integrität der Epidermis auch bei einer längeren Kultivierung als 48 h nicht ändern wird.

Als Parameter für die Viabilität der *ex vivo* Explantate, diente die Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten während der Kultivierung. Hierfür wurde der Proliferationsmarker Ki-67 genutzt, welcher klassischerweise von Keratinozyten im *Stratum basale* exprimiert wird. (1) Die Quantifizierung der Ki-67(+) Keratinozyten in den Explantaten aus nicht entzündeter Haut belegten in der vorliegenden Arbeit keinen Unterschied zwischen der nicht kultivierten Kontrolle und den Kultivierungszeiträumen 24 bis 48 h. In *ex vivo* Explantaten aus gesunder Haut konnten Kleszczyński und Fischer 2012 unter serumfreier Kultivierung bis 48 h ebenfalls Ki-67(+) Keratinozyten nachweisen. (195) Eine weitere Möglichkeit die Viabilität von kultivierten Explantaten darzustellen, ist die Messung der mitochondrialen, bzw. metabolischen Aktivität mittels MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid). Hierbei zeigten Eberlin *et al.* 2020 in *ex vivo* Explantaten aus gesunder Haut, dass eine Kultivierung bis zu 5 Tage keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität hat und somit kein negativer Einfluss durch die Kultivierung auf die Explantate entsteht. (164) Hingegen reduziert sich die prozentuale Anzahl Ki-67(+) Keratinozyten im *Stratum basale* in einem Explantatmodell aus gesunder Haut mit und ohne Sebozyten-Zelllinie SZ95 Kokultur nach 6 Tagen Kultivierung im Vergleich zur nicht kultivierten Kontrolle, wobei die Explantate ohne Kokultur weniger proliferationsfähige Keratinozyten aufwiesen als die Explantate in Kokultur. (194) Da hier keine Quantifizierung zu früheren Kultivierungszeitpunkten stattfand, können die Ergebnisse nur bedingt mit denen der vorliegenden Arbeit verglichen werden. Hinzu kommt, dass für die Ki-67(+) Quantifizierung der Explantate mit und ohne Kokultur sowie für die Kontrolle lediglich Zellen im *Stratum basale* in fünf unabhängigen Bildern des gleichen Schnittes ausgezählt wurden. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit die Keratinozyten der gesamten Epidermis

quantifiziert. Der gleiche Effekt reduzierter Ki-67(+) Keratinozyten wurde in den *ex vivo* Explantaten aus läSIONaler und periläsionaler *Hidradenitis suppurativa* mit und ohne Sebozyten-Zelllinie SZ95 Kokultur nach 3 Tagen Kultivierung beobachtet. Der Anteil Ki-67(+) Keratinozyten nahm, unabhängig von der Art des Gewebes, während der Kultivierung ab, wobei die Quantifizierung weniger proliferationsfähige Keratinozyten in den Modellen ohne Kokultur zeigt. (192) Die Daten der vorliegenden Arbeit bezüglich der Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten in den *ex vivo* Explantaten aus läSIONaler *Hidradenitis suppurativa* belegten dagegen gleichermaßen, wie die der Explantate aus nicht entzündlicher Haut, eine stabile Rate Ki-67(+) Keratinozyten während des gesamten Kultivierungszeitraumes bis zu 48 h. Auch hier könnte die Vorgehensweise bei der Quantifizierung für die Diskrepanz der Resultate verantwortlich sein. Da es weder bei den Explantaten aus nicht entzündlicher Haut noch aus läSIONaler *Hidradenitis suppurativa* zu einem Verlust der Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten kam, lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Explantatmodelle stabil sind und sich für die weiteren Untersuchungen mit der Rifampicin eignen.

Die bereits in anderen Arbeitsgruppen kultivierten Explantatkulturen aus läSIONaler *Hidradenitis suppurativa* wurden erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Während der Kultivierungszeit blieben die Morphologie der Zellen sowie die Integrität der Epidermis in den Modellen aus *Hidradenitis suppurativa* und nicht entzündlicher Haut unverändert. Eine gleichmäßige Proliferationsrate der Keratinozyten bis zu 48 h Inkubation belegt letztendlich, dass die *ex vivo* Explantate stabil sind und somit für verschiedene Untersuchungen in der Grundlagenforschung, Biomarker Screening und zur Testung der topischen Rifampicin-Nanoformulierung verwendet werden können.

4.2 Rifampicinbehandlung in Zellkulturmodellen der *Hidradenitis suppurativa*

4.2.1 Nanocarrier als Applikationsform bei mild ausgeprägten Dermatosen – zukünftige topische Anwendung bei milder *Hidradenitis suppurativa*?

Um den Nebenwirkungen einer systemischen Therapie zu umgehen, werden insbesondere Erkrankungen der Haut in leichten Schweregraden zunächst topisch behandelt. (85,196,197) Darüber hinaus verbessert die topische Applikation von Wirkstoffen deren Bioverfügbarkeit durch die Umgehung des intestinalen und/oder hepatischen *First-Pass-Effects* und stellt eine Patientinnen- und Patienten-freundliche flexible Verabreichungsform mit einfacher Einleitung

und Beendigung dar. (198) Durch ihre Anatomie limitiert die Haut die Permeationsfähigkeit von Arzneimitteln über die topische Verabreichung. Diese Problematik kann durch die Formulierung von Wirkstoffen in *Nanocarrier*, wie Liposomen oder Nanoemulsionen, umgangen werden. Zu den weiteren Vorteilen dieser Wirkstoffverabreichungssysteme gehören eine erhöhte Löslichkeit der Arzneimittel, verbesserte Stabilität und Verteilung der Wirkstoffe sowie eine kontrollierte Freisetzung. (198,199) Liposomen sind sphärische Vesikel aus Phospholipiden, bei denen der aktive pharmazeutische Wirkstoff im hydrophilen Kern oder der lipophilen Membran enthalten ist. (198,200) Sie dringen als intakte Vesikel in das *Stratum corneum* ein, wobei der Wirkstoff sich sowohl im *Stratum corneum* als auch in den unteren Schichten der Epidermis bis hin zu den Hautanhangsgebilden wie den Haarfollikeln mit den dazugehörigen Talgdrüsen verteilt. (201,202) Durch den Einsatz von Zusätzen, wie beispielsweise Ascorbinsäure kann die Penetrationsfähigkeit der Liposomen noch zusätzlich erhöht und gleichzeitig die Oxidation des Wirkstoffs positiv beeinflusst werden. (203)

Für die Behandlung dermatologischer Krankheiten wurden bereits verschiedene liposomale Nanoformulierungen hergestellt und getestet. So konnte bei einer liposomalen Hydrocortison Formulierung eine verbesserte *in vitro* und *in vivo* Wirkstofffreisetzung aus dem liposomalen Gel im Vergleich zum herkömmlichen Präparat gezeigt werden, wodurch eine Wirkstoffreduzierung bei gleichbleibender Wirksamkeit und verringerten Nebenwirkungen möglich wäre. (204) Auch in der Hautkrebstherapie gab es bereits erste Schritte eine liposomale Nanoformulierung mit Vismodegib für die Behandlung des Basalzellkarzinoms zu entwickeln. Erste Ergebnisse wiesen auf weniger Nebenwirkungen im Vergleich zur üblichen Applikationsform hin, während Versuche zur Toxizität und der Antitumoraktivität noch ausstehen. (205) Der Einbau von Rifampicin in feste Lipid Nanopartikel zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit führte bei *in vivo* pharmakokinetischen Untersuchungen tatsächlich zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit im Vergleich zu freiem Rifampicin. In Verbindung mit der hierbei vermindert gemessenen Toxizität lässt sich schlussfolgern, dass eine geringere Dosis und Dosishäufigkeit der festen Rifampicin-Lipid-Nanopartikel eine geringere oder keine Hepatotoxizität zur Folge hat, die häufig mit der Einnahme von Rifampicin verbunden ist. (206) Aus diesen Gründen wäre eine Rifampicin-Nanoformulierung auch für die Behandlung der *Hidradenitis suppurativa* interessant. Unter Erhaltung der Rifampicin Wirkung vermindert sich das Nebenwirkungspotential, womit es sich für die Behandlung einer leichten bis mittelschweren *Hidradenitis suppurativa* eignen würde.

4.2.2 Toxizität von Rifampicin

Um die immunmodulierende Wirkung von Rifampicin untersuchen zu können, musste zunächst ein Konzentrationsbereich von Rifampicin ermittelt werden, der nah der therapeutisch eingesetzten Konzentration liegt und gleichzeitig keine zytotoxischen Effekte auf die Zellkulturmodelle ausübte. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von Rifampicin, sollte dieses für die Untersuchungen der *in vitro* Wirkung in DMSO gelöst werden. DMSO wird in der biomedizinischen Forschung häufig als Lösungsmittel in Konzentrationen bis zu 1 % verwendet. (207,208) Die niedrigste hier genutzte Rifampicinkonzentration richtete sich zum einen nach den Serumkonzentrationen von Patientinnen und Patienten 2 h nach einmaliger 600 mg Rifampicin Einnahme, die zwischen 10 und 20 µg/mL liegen (121,122) und zum anderen nach Konzentrationen, welche bereits in verschiedenen Monolayer Experimenten genutzt wurden. (91,94,97,209,210) Für die höchste Rifampicinkonzentration wurde eine Konzentration oberhalb der Serumkonzentration gewählt, da aufgrund der empfohlenen Dosierung zur Behandlung der *Hidradenitis suppurativa* höhere Rifampicinkonzentrationen in der Haut angenommen werden können. Daraus entstand ein Konzentrationsbereich zwischen 0,05 mM und 1,2 mM Rifampicin. Verschiedene Versuche mit Monolayern zeigten bereits eine mechanistische Wirkung von Rifampicin nach 1 bis 2 h Behandlung. (91,94,95) Um sicher zu gehen, dass Rifampicin das Gewebe penetriert, sollten die Untersuchungen zu Rifampicin in den *ex vivo* Explantaten sowie Epidermismodellen nach einer Behandlungszeit von 2 h stattfinden, was somit einer Kurzzeitbehandlung entspricht. Da Ziglam *et al.* 2004 die höchsten Lipopolysaccharid-induzierten Zytokin Ausschüttungen nach einer 24-stündigen Behandlung im Medium messen konnte und auch weitere Arbeitsgruppen diesen Behandlungszeitraum für die Messung von Zytokinen verwendeten (75,89,91,191,211), wurde dieser zusätzliche Zeitraum gewählt. Eine 24-stündige Behandlung kann zudem Hinweise auf Effekte einer längeren Rifampicinbehandlung geben.

Damit ein erster Eindruck zur Toxizität von Rifampicin in Zellen der Haut gewonnen werden konnte, wurden humane HaCaT Keratinozyten und murine NIH 3T3 Fibroblasten, beides immortalisierte Zelllinien, mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen für 2 h gemäß dem Versuchsaufbau zu Abbildung 15 behandelt. Anschließend erfolgte die Messung des umgesetzten WST-1, was ein Indikator für eine intakte Atmungskette ist und somit für die Viabilität von Zellen steht. Mittels Positivkontrolle wurde eine Reduktion viabler Keratinozyten und Fibroblasten erzielt. Während in den Keratinozyten keine verminderte Zellviabilität durch die verschiedenen Rifampicinkonzentrationen gemessen wurde, führte die Behandlung der Fibroblasten mit 1,2 mM Rifampicin zu einer Reduktion der Zellviabilität. Um dieses Ergebnis

näher zu untersuchen, wurden primäre Fibroblasten aus nicht entzündlicher Haut mit unterschiedlichen Rifampicinkonzentrationen für 2 h behandelt, damit anhand der *cleaved Caspase 3* Proteinexpression etwaige apoptotische Prozesse ausgeschlossen werden konnten. Hierbei konnte keine *cleaved Caspase 3* Proteinexpression nachgewiesen werden, während die Positivkontrolle eine deutliche Bande aufzeigte. Daraus lässt sich schließen, dass die Rifampicinkonzentrationen keine Apoptose induzieren und somit für Versuche mit Monolayern verwendet werden konnte. Dies zeigten auch eine Reihe von Arbeiten mit anderen Zellen, eingesetzten Konzentrationen und Behandlungsdauern. Die Stimulierung von primären kortikalen Neuronen aus der Ratte in Kokultur mit BV-2 Mikrogliazellen mit Lipopolysacchariden führte nach 24 h zu einer mittels MTT gemessenen verminderten Zellviabilität, während eine zusätzliche Behandlung mit 150 µM Rifampicin diesem Effekt interessanterweise entgegenwirkte. (91) Außerdem zeigten sich im gleichen Versuchsaufbau ähnliche Wirkungen in Bezug auf die Laktat-Dehydrogenase Freisetzung und die Anzahl apoptotischer Zellen. (209) Um schwere Komplikationen in der orthopädischen Chirurgie sowie Traumatologie zu reduzieren, kommen lokale hochdosierte Antibiotika mit bis zu 100 µg/mL zur Anwendung. Aus diesem Grund analysierten Düwelhenke *et al.* 2007 den Einfluss von verschiedenen Antibiotika, darunter Rifampicin, insbesondere auf die Funktion von primären humanen Osteoblasten, der Osteosarkom Zelllinie MG36 sowie der epithelialen Zelllinie HeLa. Durch keine der getesteten Rifampicinkonzentrationen (1,5 bis 400 µg/mL) konnte eine Laktat-Dehydrogenase Freisetzung nach 24-stündiger Behandlung gemessen werden.

Außerdem wurde die toxische Wirkung der *in vitro* Rifampicinbehandlung in den *ex vivo* Explantaten untersucht. Für die Bewertung zytotoxischer Effekte der Rifampicin-Nanoformulierung, wurden Tests mit nicht entzündlichen Epidermismodellen sowie Explantatkulturen durchgeführt. Hierbei analysierte Parameter betrafen die Morphologie der Modelle, Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten, Apoptoseinduktion, Zytotoxizität und epidermale Differenzierung. Durch die *in vitro* Rifampicinbehandlungen und topische Rifampicin-Nanoformulierung konnten in den Explantatkulturen bis 24 h Behandlung keine morphologischen Veränderungen anhand der Hämatoxylin-Eosin Färbung beobachtet werden. Die Epidermismodelle wurden über drei verschiedene Zeiträume (2, 24 und 48 h) mit der Rifampicin-Nanoformulierung behandelt. Während auch hier bei der 2-stündigen Behandlung keine morphologischen Veränderungen auftraten, war bei den mit den unbeladenen Liposomen und Rifampicin-Nanoformulierung behandelten Modellen das *Stratum corneum* nach 24 und 48 h verdickt. In Explantatkulturen, die topisch mit Grüntee Extrakten für 3, 7 und 10 Tage behandelt wurden, beobachteten die Autoren ebenfalls ein angeschwollenes *Stratum corneum* im Verlauf der Kultivierung, die restlichen Schichten der

Epidermis blieben dagegen in ihrer Morphologie und Integrität unauffällig. (160) Möglicherweise bewirken die hydratisierenden Inhaltsstoffe in den Formulierungen nach einer längeren Behandlungsdauer ein aufgeschwemmteres *Stratum corneum*. In den *ex vivo* Explantaten aus *Hidradenitis suppurativa*, welche mit der Rifampicin-Nanoformulierung behandelt wurden, trat eine solche Wirkung nach 24 h nicht auf.

Die Quantifizierung proliferationsfähiger Zellen innerhalb der Epidermis der sowohl *in vitro* mit Rifampicin als auch topisch mit der Rifampicin-Nanoformulierung behandelten Explantate und Epidermismodelle ergab keinen Unterschied Ki-67(+) Keratinozyten. Lediglich in den Epidermismodellen, die mit der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung über 48 h behandelt wurden, war eine leicht sinkende Tendenz Ki-67(+) Keratinozyten zu vermerken. Dieser Umstand könnte daher zustande kommen, dass nach der Behandlungszeit ein Stimulus von dermalen Zellen fehlt, die sonst im Austausch mit den Keratinozyten stehen. (212) Peramo und Marcelo 2013 stellten in einer Explantatkultur aus gesunder Haut, welche mit Rapamycin über 5 Tage behandelt wurde, eine reduzierte Anzahl Ki-67(+) Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle fest. Zur Überprüfung, ob die sinkende Proliferation aus einer gesteigerten Apoptose durch Rapamycin resultiert, wurden *cleaved Caspase 3(+)* Zellen quantifiziert. Hierbei ergab sich kein Unterschied zwischen den unbehandelten Explantaten und den mit Rapamycin behandelten. Die Autoren schlossen daraus, dass Rapamycin die Proliferation hemmt ohne die Apoptose zu erhöhen, sondern vermutlich sogar eher limitiert. (213)

Eine Apoptoseinduktion konnte weder in der Dermis noch in der Epidermis in den Explantatkulturen aus *Hidradenitis suppurativa* und nicht entzündlicher Haut nach 2 und 24 h *in vitro* Rifampicinbehandlung in DMSO nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Färbung deutete auf keine *cleaved Caspase 3(+)* Keratinozyten in den mit der Rifampicin-Nanoformulierung behandelten Epidermismodellen hin. Auch die Quantifizierung der 24-stündigen Behandlung mit der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung zeigte keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Demnach wiesen die beiden Rifampicinbehandlungsformen keine toxische Wirkung auf die *in vitro* Modelle auf und bestätigten somit die zuvor beschriebenen Daten zu den Monolayern.

Des Weiteren belegte die Messung der Laktat-Dehydrogenase Freisetzung in das Medium der Epidermismodelle gleichermaßen, dass die Behandlung mit der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung bis zu 48 h keine Zytotoxizität induzierte. Für die topische Therapie der *Hidradenitis suppurativa* insbesondere als Haarfollikel-gezielte Applikation wurden bereits feste Lipidnanopartikel, die Rifampicin und Clindamycin Phosphat in Kombination enthalten, entwickelt. Die festen Lipidnanopartikel wurden mit jeweils 4 mg Rifampicin und Clindamycin

Phosphat beladen, welche nahezu vollständig eingeschlossen wurden. Hinsichtlich Hautreizungstests gemäß der Leitlinie Nr. 439 der europäischen Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung wurde der MTT-Assay nach Behandlung von EpiSkin™ Epidermismodellen mit den Rifampicin und Clindamycin Phosphat-haltigen Lipidnanopartikeln durchgeführt. Als potentiell reizend galt eine Behandlung, die zu $\leq 50\%$ viablen Zellen führte. Pereira *et al.* 2021 ermittelten in diesem Test 76 % viable Zellen, womit die Rifampicin-Clindamycin-Phosphat-Formulierung als nicht reizend einzustufen war. (214) Bezogen auf die Ergebnisse der Laktat-Dehydrogenase Freisetzung durch die Rifampicin-Nanoformulierung, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, kann daraus geschlossen werden, dass die Rifampicin-Nanoformulierung ebenfalls als nicht reizend zu klassifizieren ist.

Neben einer möglichen zytotoxischen Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung mussten auch etwaige funktionelle Konsequenzen für die Zellen, die unmittelbar in Kontakt mit der Formulierung kommen, bei der Bewertung der Sicherheit der Formulierung beachtet werden. Daher wurden Einflüsse der Rifampicin-Nanoformulierung weiterhin auf die Differenzierung der Keratinozyten in den Epidermismodellen untersucht, was bislang in der Literatur noch nicht näher beleuchtet wurde. Der immunhistochemische Nachweis von Filaggrin zeigte eine von der Behandlung unabhängige gleichmäßige Expression. Involucrin ist am Beginn des Verhornungsprozesses der Epidermis beteiligt und ist entsprechend stärker im *Stratum granulosum* aber auch im *Stratum spinosum* exprimiert. (186) Ein solches Expressionsmuster wiesen die Epidermismodelle auf, die mit der Rifampicin-Nanoformulierung behandelt wurden. Was auf eine natürliche Differenzierung in den unteren *Strati* der Epidermis hindeutete. Unabhängig von der Behandlung und Behandlungsdauer demonstrierte die immunhistologische Färbung eine gleichmäßige Zytokeratin-10 Verteilung. Anhand der Zytokeratin-10 Expression lassen sich Aussagen zur frühen Differenzierung der Keratinozyten treffen. (187,188) In diesem Zusammenhang konnte abgeleitet werden, dass die frühe Differenzierung der Keratinozyten nicht durch die Behandlung mit der Rifampicin-Nanoformulierung gestört wurde.

Schließlich lässt sich sagen, dass die verwendeten Rifampicinkonzentrationen sowohl in DMSO gelöst als auch in Form der Rifampicin-Nanoformulierung keine zytotoxische Wirkung aufwiesen. Beurteilt wurde dies durch die Zellviabilität in Monolayern und Morphologie, Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten und Apoptoseinduktion in *ex vivo* Explantaten und Epidermismodellen sowie Zytotoxizität in den Epidermismodellen. Des Weiteren zeigte der Nachweis der Differenzierungsmarker keine funktionellen Auswirkungen auf die

Keratinocyten in den Epidermismodellen durch die Rifampicin-Nanoformulierung, weshalb im Folgenden immunmodulierende Wirkung untersucht werden konnte.

4.2.3 Immunmodulierende Wirkung und Wirksamkeit von Rifampicin

In der Literatur ist bereits aus *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bekannt, dass Rifampicin eine immunmodulierende Wirkung besitzt. (89–97) Daher sollte ein Biomarker für die Wirksamkeit der Rifampicin-Nanoformulierung bei *Hidradenitis suppurativa* gefunden werden. Studien von van der Zee *et al.* 2009, Albrecht *et al.* 2018, Yao *et al.* 2021 und van Straalen *et al.* 2021 berichteten bereits über eine Verbesserung der *Hidradenitis suppurativa* unter kombinierter systemischer Behandlung mit Clindamycin und Rifampicin. (99–101,104) Außerdem zeigte Rifampicin einen antientzündlichen Effekt im Kontext von anderen immunmedierten chronischen Krankheiten wie der Psoriasis. Hier war die Effizienz von Rifampicin signifikant höher im Vergleich zum Placebo. (215) Dieser Effekt bestätigt das entzündungshemmende Potenzial von Rifampicin bei Autoimmunkrankheiten. Da die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL10 und TNF- α im Blut, Gewebe und Medium von *ex vivo* Explantaten als erhöht bei *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten beschrieben wurden (43,44,62,68–71), wurde zunächst der Einfluss einer *in vitro* Rifampicinbehandlung auf die Sekretion dieser Zytokine betrachtet. Darüber hinaus wurde die Ausschüttung weiterer Zytokine untersucht, bei denen im weitesten Sinne ein Zusammenhang zur *Hidradenitis suppurativa* bestehen könnte. (69,75,191) In der vorliegenden Arbeit reduzierte eine *in vitro* Rifampicinbehandlung die Ausschüttung von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α in läsionalen *Hidradenitis suppurativa* Explantatkulturen nach 24 h Behandlung signifikant. Hingegen bestätigte die Immunhistochemie keine signifikante Reduktion von IL-1 β (+) und TNF- α (+) Zellen. Hierbei muss beachtet werden, dass die Zytokinen, welche im Medium gemessen wurden, lösliche Zytokine sind. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei denen nach der Immunhistochemischen Färbung quantifizierten Zytokine um intrazellulären Zytokine. Es ist möglich, dass die verminderte Ausschüttung auch zu einer verminderten Signalwirkung in der Zielzelle führte, was jedoch nach einem so frühen Zeitpunkt noch nicht an der Anzahl der Zielzellen zu beobachten ist. Ein weiterer Grund für den Unterschied könnte sein, dass die Zytokin-positiv gezählten Zellen die Zytokine ausgeschüttet haben und daher der Effekt durch die Rifampicinbehandlung in den Zellen nicht so ausgeprägt ist. Ziglam *et al.* 2004 untersuchte Lipopolysaccharid-induzierte Zytokinspiegel nach einer Rifampicinbehandlung in primären Monozyten *in vitro* und demonstrierte eine verminderte IL-1 β und TNF- α -Ausschüttung, was mit den hier gezeigten Ergebnissen übereinstimmt. Im

Gegensatz zu diesen Daten, beschrieben die Autoren erhöhte IL-6 und IL-10 Level. (89) Dies kann durch die unterschiedlichen Zelltypen erklärt werden, die in den Untersuchungen Anwendung fanden. Während für die Ergebnisse dieser Arbeit aus heterogenem *Hidradenitis suppurativa* Immunzellinfiltrat stammen, untersuchten Ziglam *et al.* 2004 lediglich Effekte in primären Monozyten. (216) Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten die geringeren Rifampicinkonzentrationen sein, die Ziglam *et al.* 2004 nutzten. Anstelle von Konzentrationen zwischen 5 µg/mL und 20 µg/mL wurden hier Rifampicinkonzentrationen zwischen 41 bzw. 988 µg/mL (0,05 bzw. 1,2 mM) eingesetzt. Nach vorheriger Lipopolysaccharid-Induktion, führte die Behandlung mit Rifampicin in primären Mikroglia, Astrozyten und Makrophagen zu einer TNF- α -Reduktion. (90) Im Gegensatz dazu hemmte Rifampicin die Lipopolysaccharid-induzierte Hochregulierung der IL-1 β und TNF- α -mRNA-Expression nicht in polymorphkernigen Leukozyten, sondern reduzierte stattdessen die IL-8 Rezeptor-mRNA-Expression. (95) Außerdem resultierte die Behandlung mit Rifampicin in einem *in vivo* Modell der Multiplen Sklerose in einem Rückgang der IL-6 und IL-17A Serumspiegel. (93) In der vorliegenden Arbeit befanden sich die Level der Zytokine IL-2, IL-4, IL-12/IL23p40, IL-13, IL17A und IL-17F bereits bei der unbehandelten Kontrolle unterhalb der Nachweisgrenze im Medium der *ex vivo* Explantate aus *Hidradenitis suppurativa*. Auch van der Zee *et al.* 2011 konnten u. a. IL-2, IL-4 und IL-12p70 im Medium von kultivierten Explantaten aus *Hidradenitis suppurativa* nicht nachweisen und schlussfolgerten daraus, dass diese Zytokine in den Entzündungsprozessen der *Hidradenitis suppurativa* keinen großen Einfluss haben. (191) In einer klinischen Studie wurden verschiedene Zytokine in der Wundflüssigkeit von Patientinnen und Patienten mit *Hidradenitis suppurativa* und chronischen Wunden miteinander verglichen, um den Einfluss von Entzündung auf die Wundheilung zu untersuchen. Hier waren IL-2, IL-4, IL-12/IL23p40, IL-13 sowie IL-17A messbar, zwischen den beiden Kohorten bestand allerdings kein Unterschied. (69) Interleukin-2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von regulatorischen T-Zellen, weshalb das Fehlen von IL-2 zu einem Defizit regulatorischer T-Zellen führt und somit zu einer Autoimmunität beiträgt. (217) *Hidradenitis suppurativa* steht immer wieder in Diskussion autoimmune Eigenschaften aufzuweisen. (55,218,219) Allerdings scheint IL-2 nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und denen der beschriebenen Literatur eine eher untergeordnete Relevanz in der *Hidradenitis suppurativa* zu haben. Der Nachweis von IL-4 und IL-13 im *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen- und Patientenkollektiv ist insofern schlüssig, als dass beide Zytokine als pruritogen gelten und bereits in der Haut von Patientinnen und Patienten mit Atopischer Dermatitis gefunden wurden. (220) Neben Schmerzen wird Juckreiz häufig als Symptom von Patientinnen und Patienten mit *Hidradenitis suppurativa* genannt. Tatsächlich korreliert die Intensität des Juckreizes mit dem

Dermatologischen Lebensqualitätsindex (221), einem Index, welcher mittels Fragebogen in der klinischen Routine erhoben wird. Wolk *et al.* 2017 untersuchten im Serum von Patientinnen und Patienten mit Psoriasis und *Hidradenitis suppurativa* verschiedene Zytokine, Chemokine und Proteine. Dabei bestimmten sie die Konzentrationen von u. a. IL-12/IL23p40 und IL-17A. Verglichen mit der gesunden Kontrolle konnte weder im Blut von Psoriasis noch *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten ein Unterschied gemessen werden. (71) Für eine Untersuchung zur antientzündlichen Wirkung von Biologika wurden *ex vivo* Explantate aus läSIONALER *Hidradenitis suppurativa* über 24 h kultiviert. Das Medium enthielt dabei Prednisolon, Adalimumab, Infliximab, Secukinumab, Ustekinumab, Rituximab oder verblieb unbehandelt. Während auch hier kein IL-12/IL23p40 messbar war, konnten Effekte der Behandlungen in Bezug auf die IL-17A Sekretion beobachtet werden. Diese waren jedoch bei den meisten Patientinnen und Patienten im unteren Bereich der Nachweisgrenze. (75) In den meisten hier beschriebenen Untersuchungen zu IL-17 wurde das Zytokin im Serum oder in Wundflüssigkeit nachgewiesen, hingegen nur in geringen Konzentrationen im Medium von Explantatkulturen. Möglicherweise sind die produzierten IL-17 Level in dieser Umgebung zu gering, weshalb IL-17 sich weniger als Biomarker in einem Versuchsaufbau, wie er hier genutzt wurde, eignet. Der Vergleich zwischen der Rifampicin-vermittelten Reduktion von Zytokinen in einem *ex vivo* Modell der *Hidradenitis suppurativa* mit denen der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse der Fachliteratur, weist schließlich auf das Potenzial von Rifampicin hin, auch bei Patientinnen und Patienten mit *Hidradenitis suppurativa* entzündungshemmende Reaktionen zu vermitteln. Daher eignen sich IL-6, IL-8, IL-10 und insbesondere IL-1 β sowie TNF- α als Biomarker für die Effizienztestung von Rifampicin. Für die Wirksamkeitstestung der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung wurde die IL-1 β Ausschüttung in das Medium nach einer 24-stündigen Behandlung ermittelt. Die Messung zeigte eine verminderte IL-1 β Sekretion durch die Rifampicin-Nanoformulierung. Rancan *et al.* 2021 erarbeiteten ein *ex vivo* Explantatmodell für entzündete Haut. Hierbei kultivierten sie Biopsien von gesunden Probanden in Kokultur mit der T-Zell-Zelllinie Jurkat und einem Mix aus Phytohämagglutinin, IL-17A sowie IL-22 als inflammatorischen Stimulus über 24 h und untersuchten den topischen Einfluss einer Rapamycin-haltigen *Core-multi-shell*-Formulierung auf T-Zellen. Rapamycin ist ein Inhibitor des *mecanistic target of rapamycin* und kann so über verschiedene Signalwege die Zytokinproduktion inhibieren. Als Mitglied der Makrolid-Familie, von der bei topischer Anwendung bekannt ist, dass es zu Hautirritationen kommen kann, wurde der Effekt der Rapamycin-haltige *Core-multi-shell*-Formulierung dahingehend getestet. Dazu wurde die Sekretion von IL-1 α , IL-6 und IL-8 untersucht, welche als auch Marker für Hautirritationen dienen. Eine erhöhte Ausschüttung konnte durch die Behandlung nicht beobachtet werden, jedoch eine tendenziell geringere IL-

6 Sekretion. (222) Diese Tendenz kann auch mit einer immunmodulierenden Wirkung der Formulierung assoziiert werden. Vergleicht man die Ergebnisse der *in vitro* Rifampicinbehandlung mit denen der Rifampicin-Nanoformulierung, kann abgeleitet werden, dass Rifampicin antientzündlich wirkt, indem es die Ausschüttung von IL-1 β vermindert und somit ein Biomarker für die Effizienz der Rifampicin-Nanoformulierung gefunden wurde.

Im Vergleich zu gesunder Haut befindet sich in der Haut von *Hidradenitis suppurativa* Patientinnen und Patienten eine erhöhte Anzahl an CD3(+)-T-Zellen. (46,184) Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Rifampicin die CD3-T-Zellen bei *Hidradenitis suppurativa* beeinflusst, wurden die CD3(+)-T-Zellen in den Explantaten der *Hidradenitis suppurativa* Haut nach der *in vitro* Behandlung mit Rifampicin in DMSO und der Rifampicin-Nanoformulierung quantifiziert. Durch die beiden Behandlungen konnte kein Effekt auf die CD3(+)-T-Zellen nachgewiesen werden. Bereits sehr früh wurde herausgefunden, dass eine 3-stündige Rifampicinbehandlung die Phytohämagglutinin-induzierte Proteinbiosynthese von Lymphozyten inhibiert. (223) Demnach sollten erste Effekte von Rifampicin erst bei längerer Behandlung auftreten. Rifampicin ist für die Regulierung von Cytochrom P450-Enzymen über den Pregnan X Rezeptor bekannt. Der Pregnan X Rezeptor gehört zur Familie der Kernrezeptoren und wird in der Leber und im Darm exprimiert. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass auch B- und T-Zellen den Pregnan X Rezeptor exprimieren. In diesem Zusammenhang zeigten Drubac *et al.* 2010 *in vitro*, dass Agonisten den Pregnan X Rezeptor wie Rifampicin und RU-486, ein Glukokortikoidrezeptor-Antagonist, die T-Zellfunktionen sowie die Synthese und Produktion von Interferon- γ hemmen. (224) Dieser Mechanismus könnte für die entzündungshemmende Wirkung von Rifampicin in *Hidradenitis suppurativa* Explantaten verantwortlich sein. In einem *in vivo* Modell der Multiplen Sklerose führte die Behandlung mit Rifampicin zu einer Inhibierung der Differenzierung von Typ 17 T-Helfer-Zellen im zentralen Nervensystem. Multiple Sklerose ist durch Demyelinisierung und ein neuro-inflammatorisches Infiltrat gekennzeichnet, an dem in erster Linie CD4(+)-T-Zellen beteiligt sind. (93) Es ist bekannt, dass IL-17 exprimierende CD4(+)-T-Zellen ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen bei der *Hidradenitis suppurativa* spielen. (41,43,62) Die *in vitro* Behandlung mit Rifampicin in DMSO und der Rifampicin-Nanoformulierung hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der CD3(+)-T-Zellen in den *ex vivo* Explantaten, könnte aber deren entzündliches Expressionsprofil verändern, was zu einem Rückgang der Entzündung führt. Um diese Hypothese näher zu beleuchten, wurden die CD4(+)-T-Zellen quantifiziert. Hier bewirkte die 2-stündige *in vitro* Behandlung mit Rifampicin eine tendenziell verringerte Anzahl CD4(+)-T-Zellen, während die 24-stündige *in vitro* Behandlung mit Rifampicin zu einer signifikant verringerten Anzahl CD4(+)-T-Zellen führte. Die Quantifizierung der CD4(+)-T-Zellen wies auf keinen Effekt der Rifampicin-

Nanoformulierung bezüglich CD4(+)-T-Zell Reduktion hin, was vermutlich auf die geringe Stichprobengröße und die an sich sehr heterogene Erkrankung zurückzuführen ist. Naive CD4(+)-T-Zellen, werden durch die Wechselwirkungen mit dem *Antigen-major histocompatibility complex* aktiviert, die auf antigenpräsentierenden Zellen wie Dendritische Zellen, B-Zellen oder Makrophagen sitzen. (57,61) In einem *in vivo* Modell zur Multiplen Sklerose induzierte eine Rifampicinbehandlung die signifikante Reduktion von CD4(+)/IL-17(+)-T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen und inhibierte somit die pathogenetische Differenzierung von Typ 17 T-Helfer-Zellen im Zentralnervensystem. (93) Auch aus den Daten der vorliegenden Arbeit lässt sich ableiten, dass eine Rifampicinbehandlung in einem *ex vivo* Modell der *Hidradenitis suppurativa* zu einer Änderung des Phänotyps der T-Zellen führen könnte.

Neben CD3(+)-T-Zellen sind bei der *Hidradenitis suppurativa* auch neutrophile Granulozyten vermehrt präsent. (45,55) Weder die 2-stündige und 24-stündige *in vitro* Behandlungen mit Rifampicin noch die Behandlung mit der Rifampicin-Nanoformulierung, beeinflussten die Anzahl der neutrophilen in den *Hidradenitis suppurativa* Explantatkulturen. Neutrophile sind durch vielfältige Funktionen an akuten Entzündungen beteiligt. So werden sie durch verschiedene Chemokine wie IL-8 und Wachstumsfaktoren aktiviert, die sie anschließend an den Ort der Entzündung locken. (225) *In vitro* Studien zeigten eine gehemmte Chemotaxis durch Rifampicin in humanen primären Neutrophilen. (95,226) Es ist möglich, dass eine längere Behandlung, wie sie im Rahmen der *Hidradenitis suppurativa* Therapie eingesetzt wird, diese Zellen beeinträchtigen kann. Darüber hinaus wiesen Spisani *et al.* 1997 eine konzentrationsabhängige Hemmung von Phorbol 12-Myristat 13-Acetat-induziertem Superoxid in humanen Neutrophilen nach. (226) Diese *in vitro* Daten deuten darauf hin, dass Rifampicin die Funktion der Neutrophilen beeinträchtigt, was aufgrund der Versuchsbedingungen nicht näher beurteilt werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich der Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Anzahl neutrophiler Granulozyten untersucht.

Rifampicin wird mit immunmodulierenden Effekten über die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors (227) und entzündlicher Signalwege wie dem NFκB- (94,211), dem Janus-Kinase-Signaltransduktor und Aktivatoren der Transkription- (91) und TLR2-Signalweg (94,95) in Verbindung gebracht. Immunzellen, z.B. Monozyten, Dendritische Zellen, B-Zellen und T-Zellen sowie Keratinozyten exprimieren den TLR2. Die Aktivierung durch seine Liganden Lipoprotein oder Peptidoglykan kann MAPK oder NFκB-Signalwege initiieren. Dies führt zu einer erhöhten Gentranskription und Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-6, IL-12 und TNF-α sowie des Chemokins IL-8 und löst so nachfolgende

Immunreaktionen aus. (49) Erhöhte mRNA- und immunhistochemische Expressionswerte von TLR2 wurden bereits in *Hidradenitis suppurativa* berichtet. (46,47) Daher wurden Einflüsse einer *in vitro* Rifampicinbehandlung auf die TLR2 Proteinexpression primärer Hautzellen unter basalen und entzündlichen Bedingungen untersucht. Weder bei den Keratinozyten noch bei den Fibroblasten konnte eine Wirkung von Rifampicin auf die TLR2 Proteinexpression festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde schließlich die Wirkung von Rifampicin auf TLR2(+) Zellen in den *ex vivo* Explantaten untersucht. Die Explantate weisen nicht nur die dermalen Zellen auf, sondern vielmehr auch das *Hidradenitis suppurativa*-spezifische Immuninfiltrat, welches den TLR2 Proteinexpressions Daten zufolge eher ein Ziel von Rifampicin sein könnte, als die dermalen Zellen. Dabei war eine nicht-signifikant-niedrigere Anzahl TLR2(+) Zellen nach 2 h *in vitro* Behandlung mit Rifampicin zu beobachten. Dieser Trend setzte sich auch nach 24-stündiger Behandlung fort und zeigte sich auch bei der Behandlung mit der Rifampicin-Nanoformulierung, während in den epidermalen Zellen keine Unterschiede in der Anzahl der TLR2(+) Zellen unabhängig von der Rifampicinbehandlung festgestellt wurden. Kim *et al.* 2009 und Mu *et al.* 2014 demonstrierten eine dosisabhängige Hemmung der Lipopolysaccharid-induzierten TLR2-mRNA-Expression in einer murinen Makrophagen-Zelllinie und in primären Neutrophilen. (94,95) Darüber hinaus reproduzierten Kim *et al.* 2009 diesen Befund, indem sie Makrophagen mit BAY 11-7085, einem NFκB-Inhibitor, anstelle von Rifampicin stimulierten, was auf eine NFκB-supprimierende Aktivität und damit auf eine entzündungshemmende Wirkung hinwies. Außerdem wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme der TNF-α-mRNA-Expression beobachtet, die der reduzierten TLR2-mRNA-Expression sehr ähnlich war. (94) Obwohl hier keine signifikant verringerte Anzahl TLR2(+) Zellen nachgewiesen werden konnten, stützen die Ergebnisse von Kim *et al.* 2009 und Mu *et al.* 2014 die Theorie, dass Rifampicin die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch eine Verringerung der TLR2-Expression auf infiltrierende Zellen hemmen könnte. Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass die Versuchsaufbauten unterschiedlich waren. Während Kim *et al.* 2009 und Mu *et al.* 2014 die mRNA-Expression von TLR2 maßen, basierten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf der Proteinexpression mittels Immunhistochemie. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen könnte eher auf die größere biologische Varianz und Komplexität der *ex vivo* Explantate im Vergleich zu *in vitro* Zellen zurückzuführen sein.

Im Zuge dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass sowohl eine *in vitro* Rifampicinbehandlung als auch die Anwendung der topischen Rifampicin-Nanoformulierung die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in *ex vivo* Explantaten aus läSIONALER *Hidradenitis suppurativa* Haut reduziert, was die in der klinischen Praxis beobachtete

immunmodulierenden Effekte durch Rifampicin unterstützt. Hierbei stellte sich die Reduktion der IL-1 β Ausschüttung durch die Rifampicin-Nanofomulierung als effizienter Biomarker für die Wirksamkeit heraus. In diesem Zusammenhang könnte die antientzündliche Wirkung von Rifampicin in den Explantaten aus *Hidradenitis suppurativa* durch tendenziell niedrigere TLR2 Expressionslevel resultieren. Dies führte folglich zu einer signifikant reduzierten Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α . Außerdem scheint Rifampicin in *Hidradenitis suppurativa* den Phänotyp der T-Zellen zu beeinflussen.

4.3 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich Epidermismodelle aus *Hidradenitis suppurativa* Keratinozyten generiert, die eine mehrschichtige Epidermis mit den essentiellen Differenzierungsmarkern ähnlich der läsionalen *Hidradenitis suppurativa* aufwiesen. Die *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle sekretieren die entzündlichen Zytokine IL-1 β und TNF- α und reflektieren damit die in der Literatur beschriebenen Entzündungsmuster. Somit eignen sich die *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle für die Grundlagenforschung, für Biomarker Screenings sowie Testungen von topischen und systemischen Arzneimitteln. In einem nächsten Schritt sollte getestet werden, ob mit den primären Hautzellen der *Hidradenitis suppurativa* auch Vollhautmodelle kultiviert werden können.

Nach der Etablierung stabiler *ex vivo* Explantate aus läsionaler *Hidradenitis suppurativa* konnte gezeigt werden, dass die Modelle auch gegenüber dem Einfluss einer *in vitro* Rifampicinbehandlung unempfindlich sind. Folglich konnten die *ex vivo* Explantate auch für die Validierung der Rifampicin-Nanoformulierung genutzt werden.

Unter der Applikation der Rifampicin-Nanoformulierung, die vom Institut für Pharmazeutische Technologie der Goethe Universität Frankfurt entwickelt wurde, ließen sich ebenfalls keine Proliferationsverluste, Apoptoseinduktion sowie Zytotoxizität oder Einflüsse auf die Differenzierung der Keratinozyten nachweisen. Untersuchungen zur Wirksamkeit einer *in vitro* Rifampicinbehandlung zeigten, dass Rifampicin die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in Explantatkulturen aus läsionaler *Hidradenitis suppurativa* Haut erniedrigt und sich diese Zytokine folglich als Marker für die Wirksamkeit der Rifampicin-Nanoformulierung eignen. Die Behandlung der Explantate mit der Rifampicin-Nanoformulierung führte zu einer verminderten Ausschüttung des proentzündlichen Zytokins IL-1 β , was damit die Ergebnisse

aus den *in vitro* Untersuchungen belegt und gleichzeitig die in der klinischen Praxis wahrgenommene immunmodulierende Wirkung von Rifampicin bekräftigt. Ein weiteres Ergebnis aus den Untersuchungen zur *in vitro* immunmodulierenden Wirkung belegte eine reduzierte Zahl CD4(+)-T-Zellen während die Anzahl der CD3(+)-T-Zellen von der Behandlung unbeeinflusst blieben. Dieser Befund deutet auf eine Modifizierung des T-Zell Phänotyps hin. Die immunmodulierende Wirkung von Rifampicin in den Explantaten könnte durch tendenziell erniedrigte TLR2(+) Zellen infolge verminderter CD4(+)-T-Zellen, was in reduzierter Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α resultierte, entwickeln. Inwieweit Rifampicin eine entzündungshemmende Wirkung bei *Hidradenitis suppurativa* über die Herunterregulierung von TLR2 hat, muss in weiteren Studien untersucht werden. In Bezug auf die Rifampicin-Nanoformulierung können Versuche folgen, bei denen Rifampicin fluoreszenzmarkiert wird, um so das Penetrationsverhalten des Wirkstoffs in den Explantaten näher nachvollziehen zu können.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vielversprechend aussehen und eine gute Basis bieten, um die Rifampicin-Nanoformulierung in einem individuellen Heilversuch am Menschen testen zu können.

5 Zusammenfassung

Hidradenitis suppurativa ist eine multifaktoriell-bedingte chronisch entzündliche Hauterkrankung, die durch eine Okklusion der Talgdrüseneinheit des Haarfollikels entsteht. Aus der anschließend mit Entzündung einhergehenden Ruptur des Haarfollikels entwickeln sich entzündliche Knoten, Abszesse und Fistelgänge. (39–41) In der weiteren Progression der Erkrankung kommt es zur Störung der Hautarchitektur und fibrotischen Narbenbildungen. (52) Durch Untersuchungen des entzündlichen Infiltrates konnte bereits die Beteiligung einer Reihe von Immunzellen und Entzündungsmediatoren identifiziert werden. Hierzu zählen Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Dendritische Zellen, Lymphozyten, IL-1 β sowie TNF- α . (41,45,46,51,53) Da die genaue Pathophysiologie der *Hidradenitis suppurativa* bislang unzureichend aufgeklärt ist, gibt es aktuell keine kausale Therapiemöglichkeit für die Betroffenen. (52) Die Wahl der Therapie wird anhand der Bewertung des Schweregrades nach Hurley getroffen. (25) Obwohl meisten Patientinnen und Patienten von der milden bis mittelschweren Form der *Hidradenitis suppurativa* (Hurley I und Hurley II) betroffen sind (98), werden die meisten Arzneimittel für die Behandlung von Hurley II und Hurley III von den Leitlinien empfohlen. Zu den empfohlenen Medikamenten gehören u. a. Rifampicin, meist in Kombination mit Clindamycin, sowie der TNF- α -Inhibitor Adalimumab (18,85), welche effektiv und systemisch wirken. Durch die entstehenden Nebenwirkungen wäre die Behandlung der milden bis mittelschweren *Hidradenitis suppurativa* mit diesen Medikamenten allerdings unverhältnismäßig. Um jedoch den im Verlauf der Krankheit entstehenden Hautdestruktionen vorbeugen zu können, müssten die Medikamente möglichst früh eingesetzt werden. (228) Vor diesem Hintergrund sollte in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Technologie der Goethe Universität Frankfurt eine Rifampicin-Nanoformulierung zur Behandlung milder bis mittelschwerer *Hidradenitis suppurativa* entwickelt und im Labor der dermatologischen Klinik präklinisch validiert werden.

Daher wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ein Epidermismodell aus der Haut betroffener Patientinnen und Patienten generiert, um die Rifampicin-Nanoformulierung validieren zu können. Dieses wies eine mehrschichtige Epidermis mit allen wichtigen Differenzierungsmarkern ähnlich der läsionalen *Hidradenitis suppurativa* auf und schüttete die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α aus. Als weiteres Modell wurden *ex vivo* Explantate aus läsionaler *Hidradenitis suppurativa* Haut etabliert. Für die Bewertung der Validität der Explantatkulturen wurde die Morphologie und Integrität der Epidermis mittels Hämatoxylin-Eosin sowie der Proliferationsmarker Ki-67 näher beleuchtet. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Untersuchungen für die Festlegung eines Konzentrationsbereichs, unter Verwendung von Rifampicin in DMSO gelöst als *in vitro* Behandlung, durchgeführt.

Hierbei wurde gezeigt, dass die eingesetzten Konzentrationen keine negativen Effekte bezüglich Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten oder Apoptoseinduktion ausüben. Die Behandlung von nicht entzündlichen Epidermismodellen sowie Explantatkulturen mit der Rifampicin-Nanoformulierung mit einem Wirkstoffgehalt von 0,3 % führte ebenfalls zu keinen Proliferationsverlusten, induzierte keine Apoptose oder Zytotoxizität und hatte keinen Einfluss auf die Differenzierung der Keratinozyten. Im letzten Teil der Arbeit sollte die Wirksamkeit der Rifampicin-Nanoformulierung näher beleuchtet werden. Als Antibiotikum inhibiert Rifampicin die DNA-abhängige RNA-Polymerase von Bakterien (107,108), weshalb es bei der Behandlung der Tuberkulose eingesetzt wird. (111–113) Die *Hidradenitis suppurativa* ist aber primär keine Infektionskrankheit, sondern eine von Bakterien getriggerte, entzündliche Erkrankung. (19,52,82) Aus diesem Grund ist der positive Effekt der systemischen Rifampicintherapie vermutlich vielmehr auf eine antiphlogistische Wirkung zurückzuführen. Diese Überlegung wird durch mehrere Artikel gestützt, die zeigten, dass Rifampicin die Ausschüttung von IL-1 β und TNF- α in unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Modellen hemmt. (89–91,96,97) Die anschließenden Untersuchungen zur Wirksamkeit einer *in vitro* Rifampicinbehandlung bestätigten die antientzündliche Wirkung in den Explantatkulturen indem es die Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α verminderte. Ebenso senkte die Rifampicin-Nanoformulierung die Ausschüttung von IL-1 β in den *ex vivo* Explantaten, was somit die in der klinischen Praxis beobachteten antiinflammatorischen Wirkung von Rifampicin belegt. Des Weiteren stellte sich in Untersuchungen heraus, dass Rifampicin zu einer reduzierten Zahl CD4(+)-T-Zellen führte, aber auf die CD3(+)-T-Zellen keine Auswirkungen hatte, was auf eine Veränderung des T-Zell Phänotyps hinweist.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zur Validierung der Rifampicin-Nanoformulierung, spricht nichts gegen die Testung der Rifampicin-Nanoformulierung in einem individuellen Heilversuch am Menschen.

6 Summary

Hidradenitis suppurativa is a multifactorial chronic inflammatory skin disease caused by occlusion of the sebaceous gland unit of the hair follicle. Inflammatory nodules, abscesses, and fistulous ducts are developed through the subsequent rupture of the hair follicle associated with inflammation. (39–41) Further progression of the disease is followed by disruption of skin architecture and fibrotic scarring. (52) Studies about the inflammatory infiltrate identified the involvement of a number of immune cells and inflammatory mediators. These immune cells and mediators include macrophages, neutrophil granulocytes, dendritic cells, lymphocytes, IL-1 β , and TNF- α . (41,45,46,51,53) Since the exact pathophysiology of *Hidradenitis suppurativa* has been poorly elucidated, there is currently no causal therapeutic possibility for affected patients. (52) The choice of therapy is based on Hurley's scoring of severity. (25) Although most patients are affected by the mild to moderate form of *Hidradenitis suppurativa* (Hurley I and Hurley II) (98), most drugs are recommended for the treatment of Hurley II and Hurley III. The recommended drugs comprise rifampicin, usually in combination with clindamycin, and the TNF- α inhibitor adalimumab (18,85), which act effectively and systemically. However, due to the development of side effects, treatment of mild to moderate *Hidradenitis suppurativa* would be disproportionate. In order to prevent the skin destruction that develops during the progress of the disease, the drugs would need to be started as early as possible. (228) In this context, a rifampicin nanoformulation with up to 1% active agent for the treatment of mild to moderate *Hidradenitis suppurativa* should be developed in cooperation with the Institute of Pharmaceutical Technology of the Goethe University Frankfurt and preclinically validated in the laboratory of the department of dermatology.

Therefore, in the first part of the present work, an epidermis model was generated from skin cells of affected patients, to validate the rifampicin nanoformulation. This epidermis model presented a multi-layered epidermis with all important differentiation markers similar to lesional *Hidradenitis suppurativa* and secreted the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α . As another model *ex vivo* explants of lesional *Hidradenitis suppurativa* skin were established. To evaluate the validity of the explant cultures, the morphology and integrity of the epidermis were further examined using hematoxylin eosin and the proliferation marker Ki-67. In the second part of this dissertation, studies were performed to establish a concentration range using rifampicin dissolved in DMSO as an *in vitro* treatment. The concentrations used did not exert any toxic effects regarding the proliferative capacity of keratinocytes or induction of apoptosis. Treatment of non-inflammatory epidermis models as well as explant cultures with the rifampicin nanoformulation containing 0.3 % of the active

ingredient also resulted in no loss of proliferation, did not induce apoptosis or cytotoxicity, and had no effect on keratinocyte differentiation. In the last part of the work, the efficacy of rifampicin nanoformulation was examined in more detail. Since rifampicin is an antibiotic, it inhibits the DNA-dependent RNA-polymerase of bacteria (107,108), which is why it is used in the treatment of tuberculosis. (111–113) However, *Hidradenitis suppurativa* is not primarily an infectious disease but rather an inflammatory disease triggered by bacteria. (19,52,82) For this reason, the beneficial effect of systemic rifampicin therapy is probably due to an antiphlogistic effect. This consideration is supported by several articles, which showed, that rifampicin inhibits the release of IL-1 β and TNF- α in different *in vitro* and *in vivo* models. (89–91,96,97) Subsequent studies on the efficacy of *in vitro* rifampicin treatment confirmed the anti-inflammatory effect in the explant cultures by decreasing the secretion of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and TNF- α . Similarly, rifampicin nanoformulation decreased the secretion of IL-1 β in the *ex vivo* explants, demonstrating the anti-inflammatory effect of rifampicin observed in clinical practice. Furthermore, rifampicin was found to reduce CD4(+) T-cell numbers but had no effect on CD3(+) T-cells, indicating a change in T-cell phenotype.

Based on the results for the validation of the rifampicin nanoformulation presented in this thesis, there is no reason why the rifampicin nanoformulation should not be tested in compassionate use/ off-label use in a human trial.

7 Anhang

7.1 Apoptoseinduktion in primären Fibroblasten

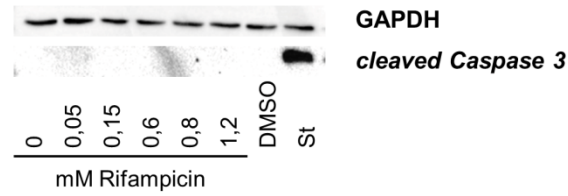


Abbildung 32: Cleaved Caspase 3 Proteinexpression in primären Fibroblasten.

Fibroblasten aus nicht entzündlicher Haut wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen (0-1,2 mM) und Lösungsmittelkontrolle (DMSO) über einen Zeitraum von 2 h sowie 1 μ M Staurosporin für 6 h (St, positiv Kontrolle) behandelt. Die Lysate wurden für die Analyse der Proteinexpression mit spezifischen Antikörpern gegen die *cleaved Caspase 3* und Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Westernblots aus n = 4 unabhängigen Versuchen.

7.2 Toxizität einer *in vitro* Rifampicinbehandlung in *ex vivo* Explantaten

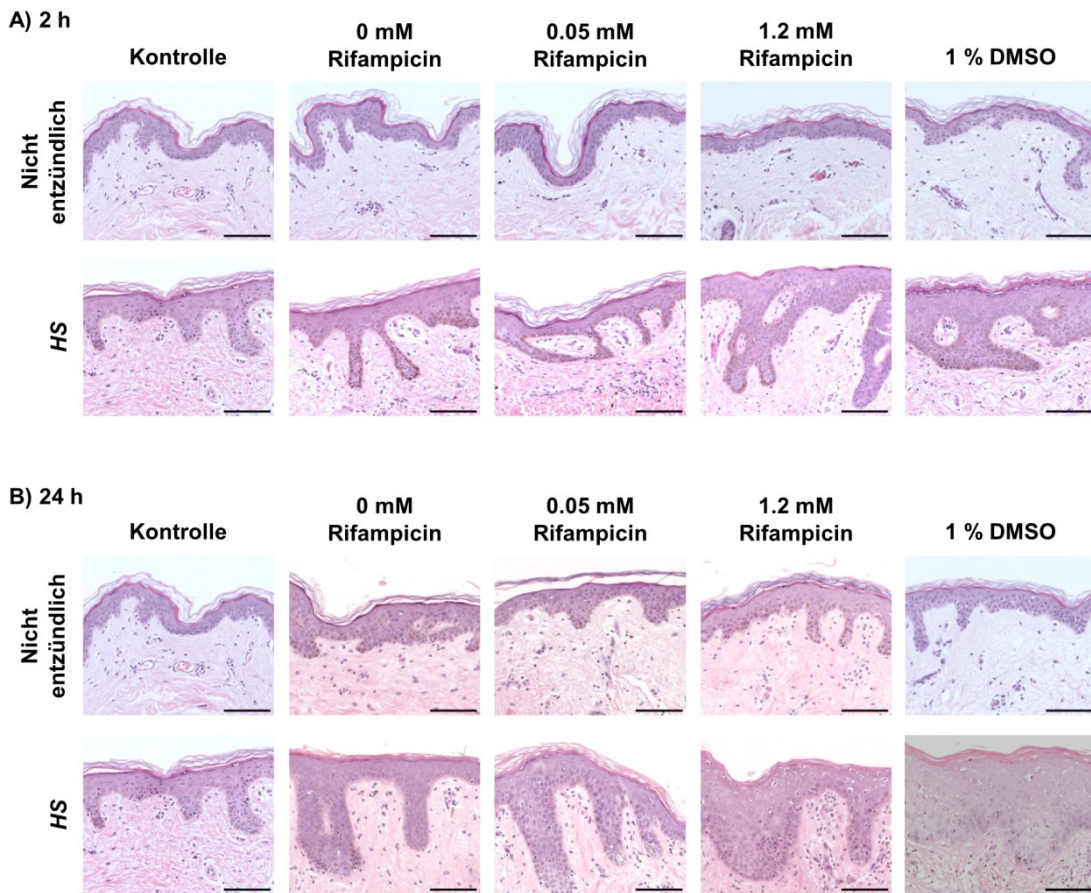


Abbildung 33: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Morphologie von nicht entzündlichen und *Hidradenitis suppurativa ex vivo* Explantaten.

Explantate aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa* (HS) wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. Für die Beurteilung eines Einflusses von Rifampicin auf die Morphologie von Explantaten wurden Schnitte dieser mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Abgebildet sind repräsentative Schnitte (Nicht entzündliche Haut 0-1.2 mM Rifampicin n = 5, 1 % DMSO n = 2; *Hidradenitis suppurativa* 0-1.2 mM Rifampicin n = 8, 1 % DMSO n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm). (modifiziert nach Haferland *et al.* 2022)

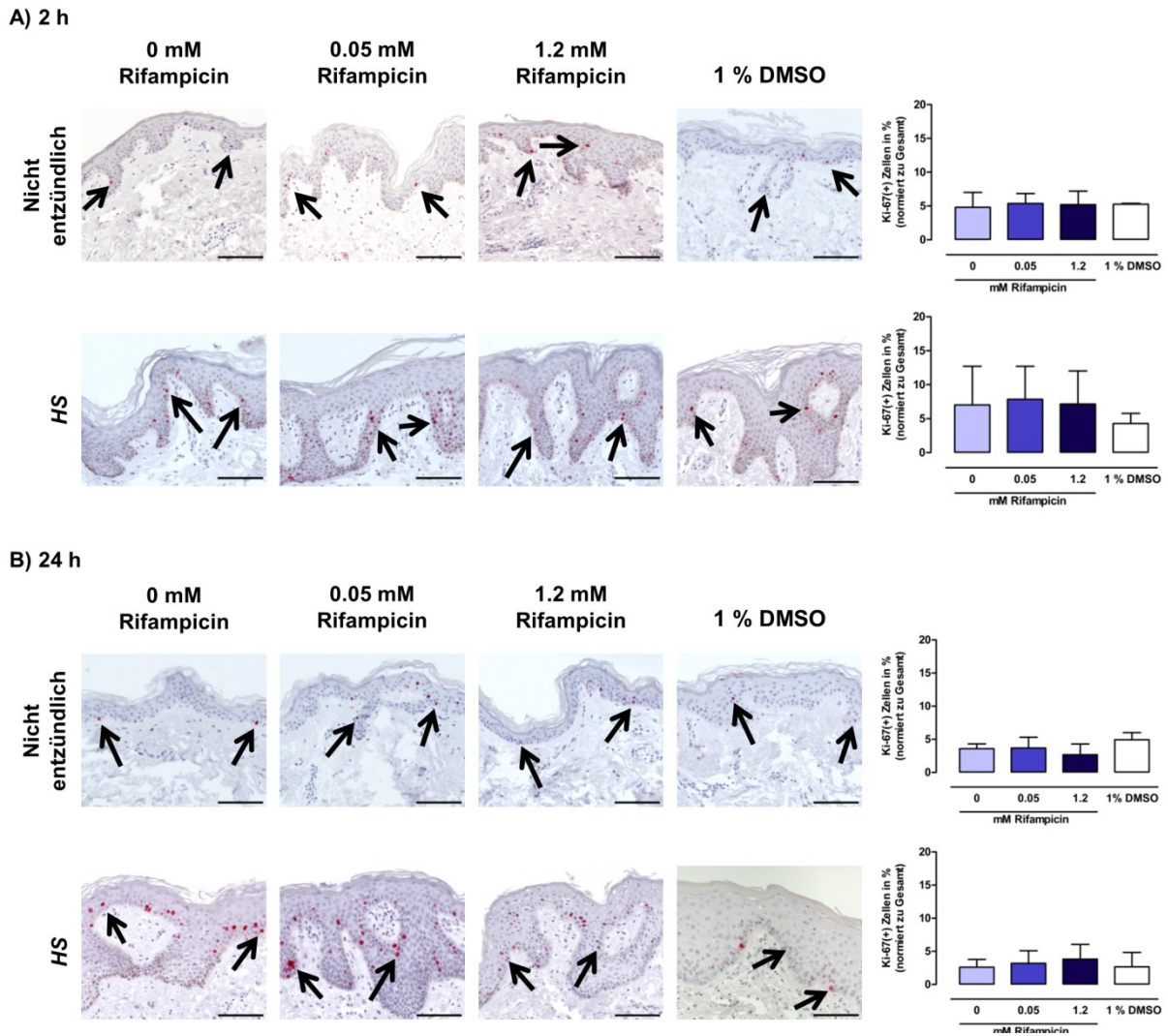


Abbildung 34: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten in *ex vivo* Explantaten aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa*.

Explantate aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa* (HS) wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. Für die Beurteilung eines Einflusses von Rifampicin auf die Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten wurden Schnitte dieser immunhistochemisch mit einem Anti-Ki-67 Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (Nicht entzündliche Haut 0-1.2 mM Rifampicin $n = 5$, 1 % DMSO $n = 2$; *Hidradenitis suppurativa* 0-1.2 mM Rifampicin $n = 8$, 1 % DMSO $n = 3$; Maßstabsbalken = 100 μm ; schwarze Pfeile = Ki-67(+) Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. (modifiziert nach Haferland *et al.* 2022)

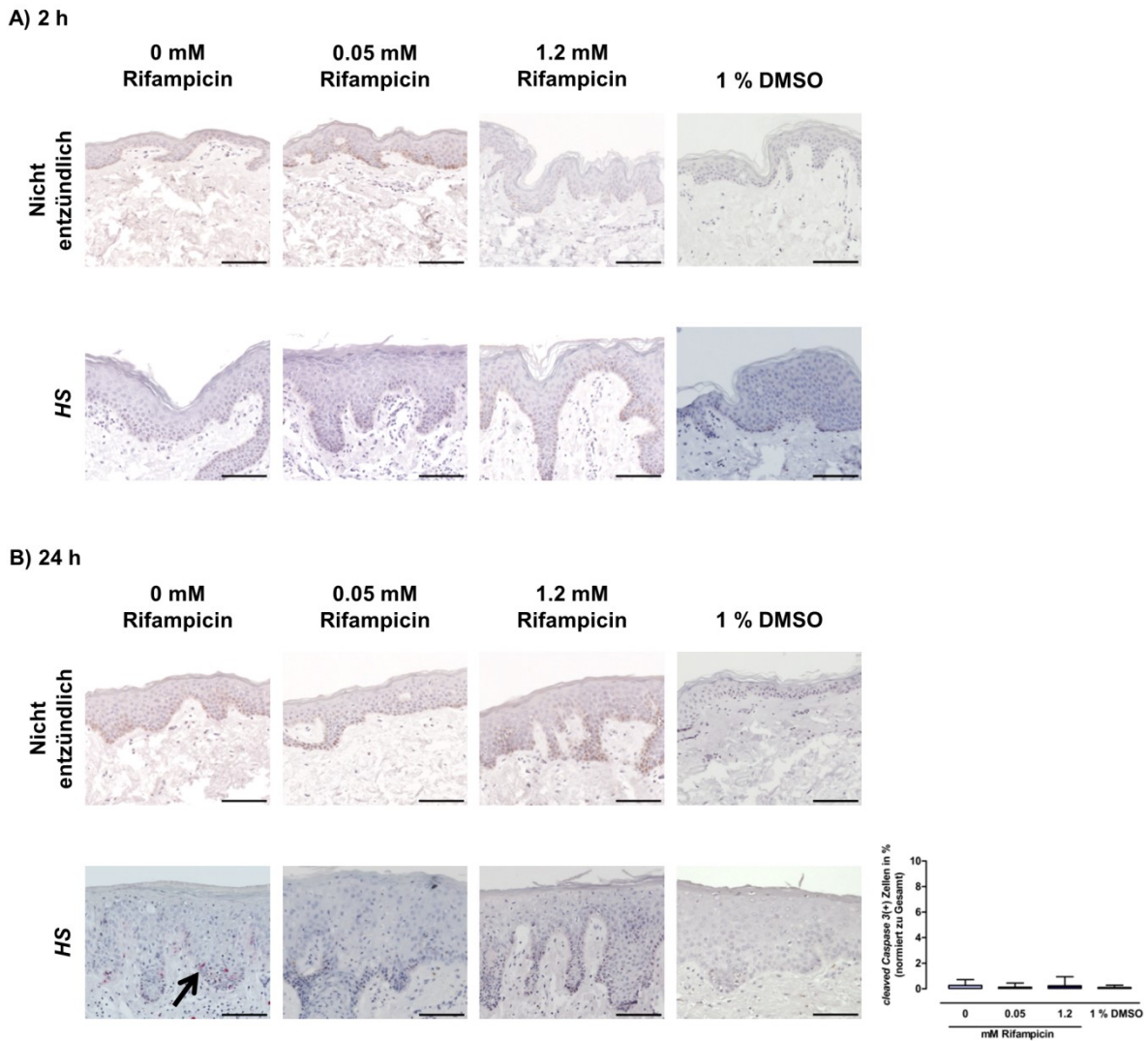
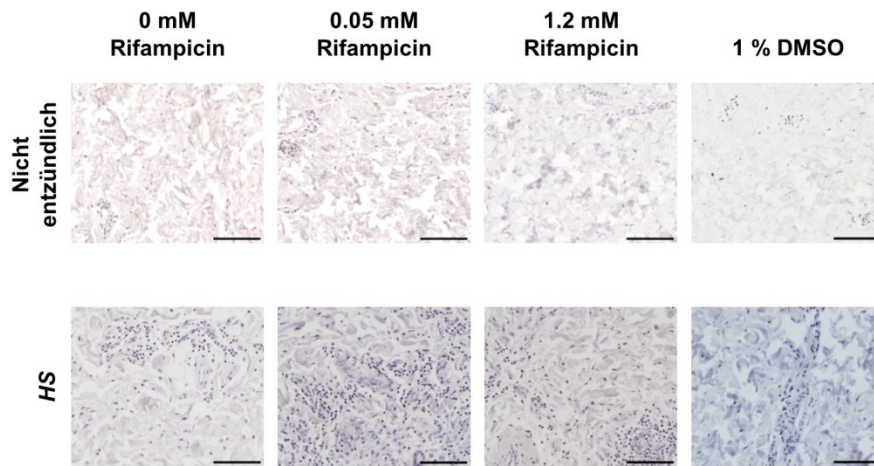


Abbildung 35: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Apoptoseinduktion in der Epidermis von *ex vivo* Explantaten aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa*.

Explantate aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa* (HS) wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. Für die Beurteilung der epidermalen Apoptoseinduktion wurden Schnitte dieser mit einem Anti-*cleaved Caspase 3*-Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (Nicht entzündliche Haut 0-1.2 mM Rifampicin n = 5, 1 % DMSO n = 2; *Hidradenitis suppurativa* 0-1.2 mM Rifampicin n = 8, 1 % DMSO n = 3; Maßstabsbalken = 100 μ m; schwarze Pfeile = *cleaved Caspase 3*(+) Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet. (modifiziert nach Haferland *et al.* 2022)

A) 2 h



B) 24 h

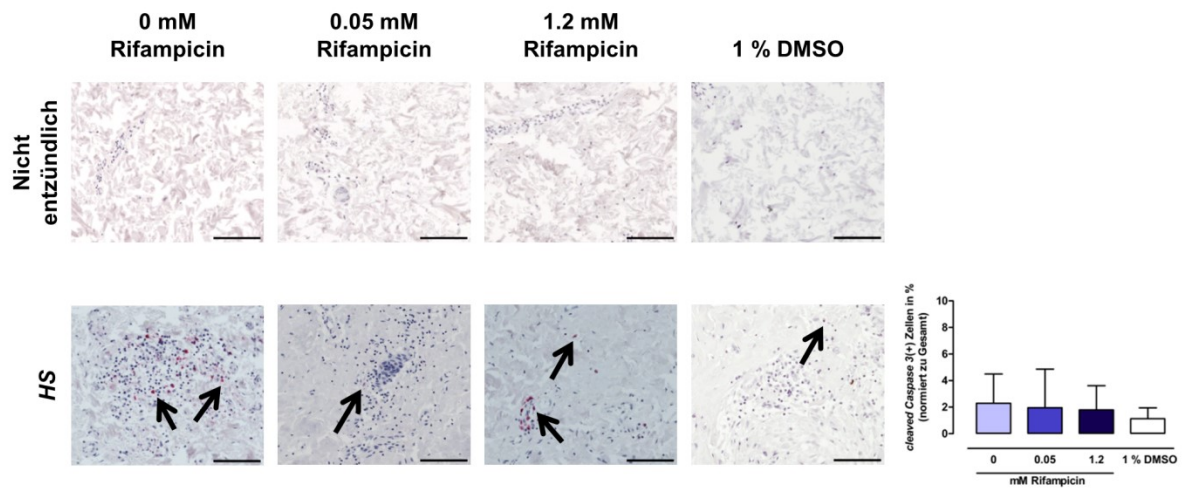


Abbildung 36: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Apoptoseinduktion in der Dermis von *ex vivo* Explantaten aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa*.

Explantate aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa* (HS) wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. Für die Beurteilung der dermalen Apoptoseinduktion wurden Schnitte dieser mit einem Anti-*cleaved Caspase 3*-Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (Nicht entzündliche Haut 0-1.2 mM Rifampicin n = 5, 1 % DMSO n = 2; *Hidradenitis suppurativa* 0-1.2 mM Rifampicin n = 8, 1 % DMSO n = 3; Maßstabsbalken = 100 μ m; schwarze Pfeile = *cleaved Caspase 3*(+) Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet.

7.3 Immunmodulierende Wirkung einer *in vitro* Rifampicinbehandlung in *ex vivo* Explantaten

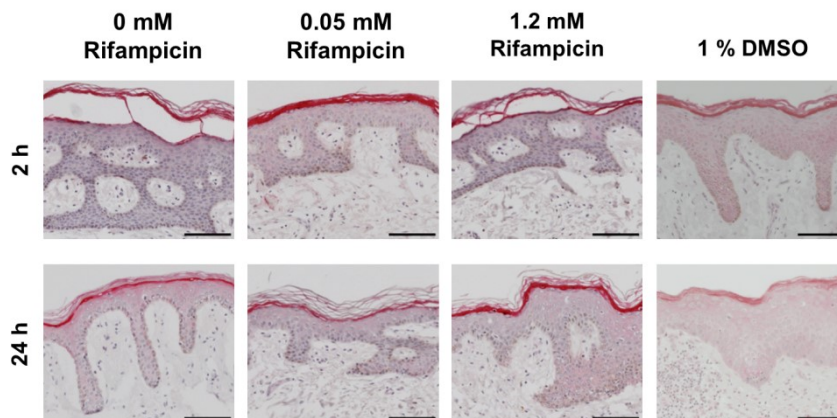


Abbildung 37: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf den *Toll-like* Rezeptor 2 in der Epidermis von *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen oder Lösungsmittelkontrolle (DMSO) kultiviert. Für die Beurteilung der Wirkung von Rifampicin wurden Schnitte dieser mit einem Anti-*Toll-like* Rezeptor 2-Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte (0-1.2 mM Rifampicin n = 7, 1 % DMSO n = 3; Maßstabsbalken = 100 μ m).

7.4 Toxizität der Rifampicin-Nanoformulierung in Epidermismodellen

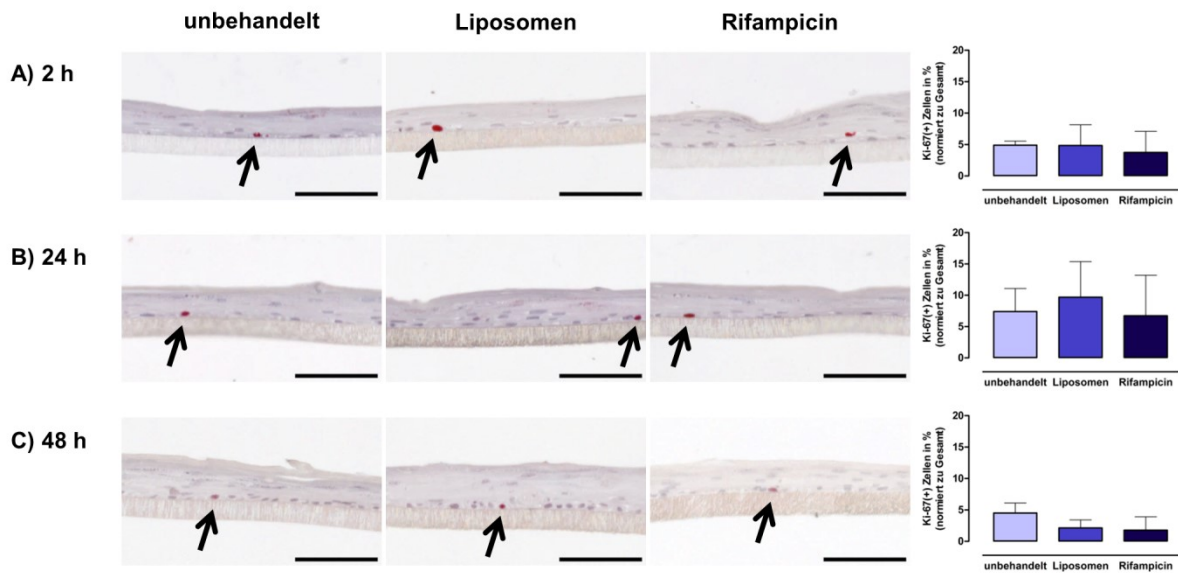


Abbildung 38: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten in Epidermismodellen.

Epidermismodelle aus *präputialen* Keratinozyten wurden für A) 2, B) 24 und C) 48 h mit unbeladenen Liposomen oder der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Durch immunhistochemischen Nachweis wurden die Epidermismodelle mittels Ki-67-Färbung hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten untersucht. Abgebildet sind repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm; schwarze Pfeile = Ki-67(+) Zellen). Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet.

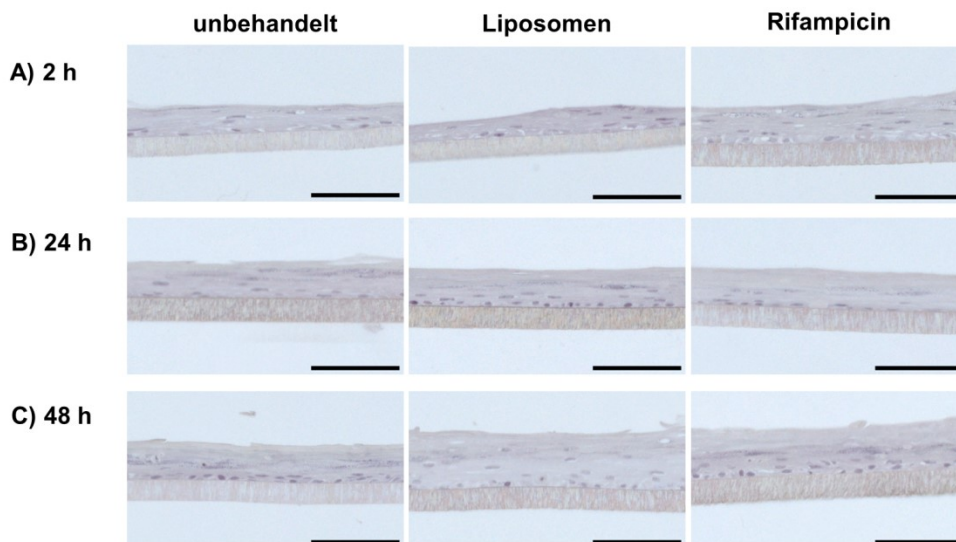


Abbildung 39: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Apoptoseinduktion in Epidermismodellen.

Epidermismodelle aus *präputialen* Keratinozyten wurden für A) 2, B) 24 und C) 48 h mit unbeladenen Liposomen oder der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Für die Beurteilung der epidermalen Apoptoseinduktion in den Epidermismodellen, wurden Schnitte dieser mit einem Anti-*cleaved Caspase 3*-Antikörper angefärbt. Abgebildet sind repräsentative Ausschnitte (n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm).

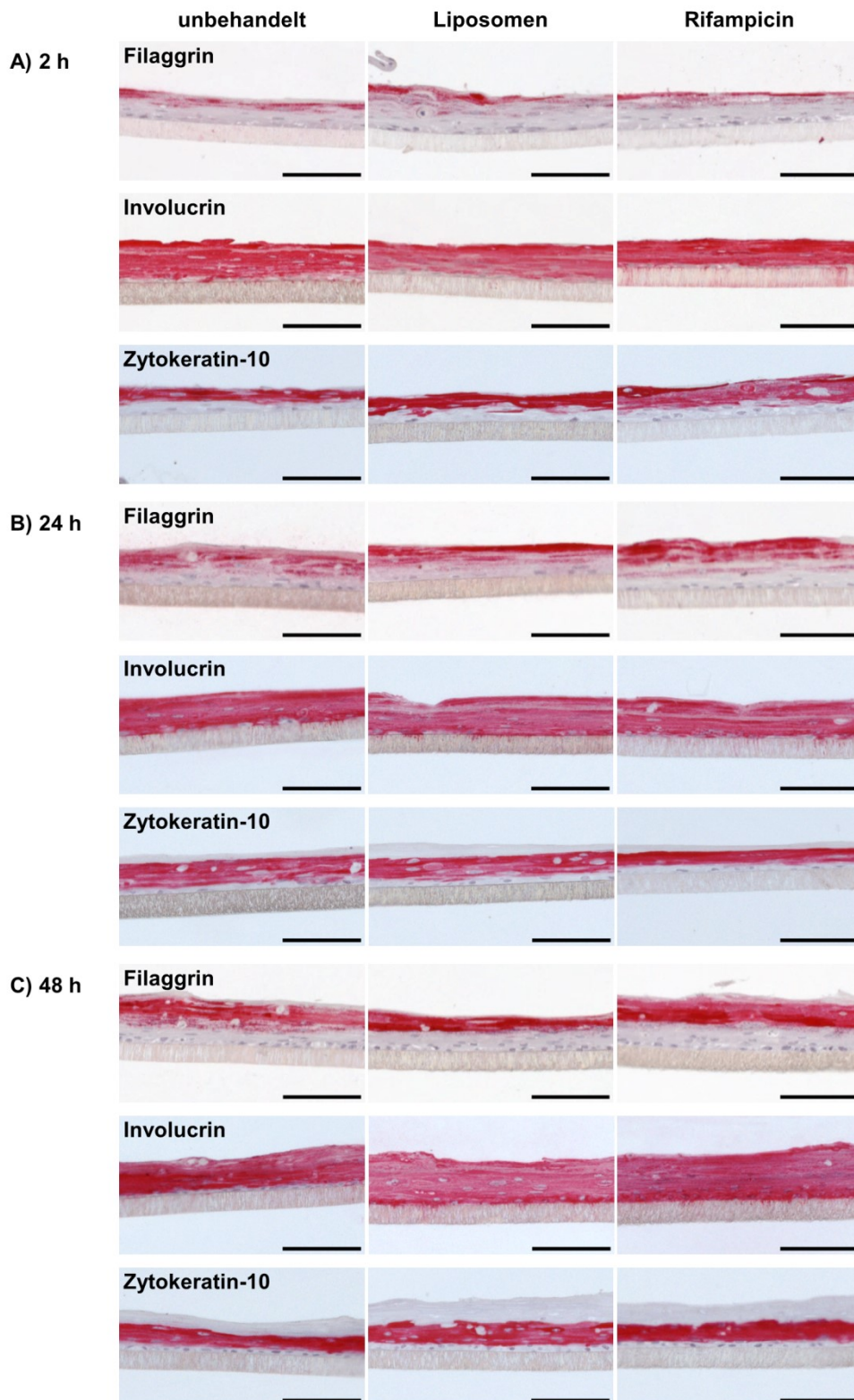


Abbildung 40: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Differenzierung von Keratinozyten in Epidermismodellen.

Epidermismodelle aus *präputialen* Keratinozyten wurden für A) 2, B) 24 und C) 48 h mit unbeladenen Liposomen oder der 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Durch immunhistochemischen Nachweis wurden die Epidermismodelle mittels Filaggrin-, Involucrin- und Zytokeratin-10-Färbung hinsichtlich epidermaler Differenzierung untersucht. Gezeigt werden repräsentative Epidermismodell-Ausschnitte (n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm).

7.5 Toxizität der Rifampicin-Nanoformulierung in *ex vivo* Explantaten

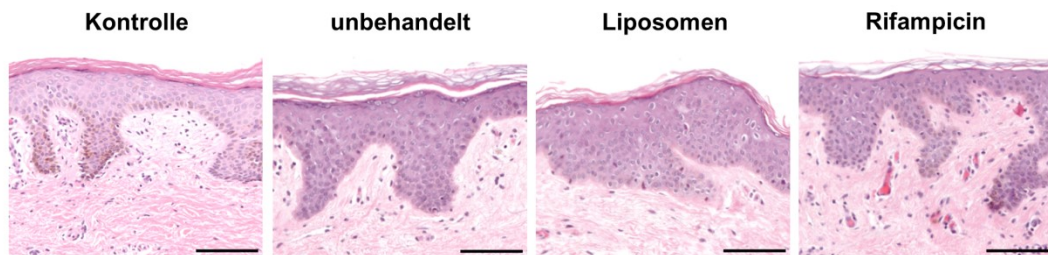


Abbildung 41: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Morphologie von *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden für 24 h mit unbeladenen Liposomen oder 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Für die Beurteilung eines Einflusses der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Morphologie wurden dieser mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Abgebildet sind repräsentative Schnitte (n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm).

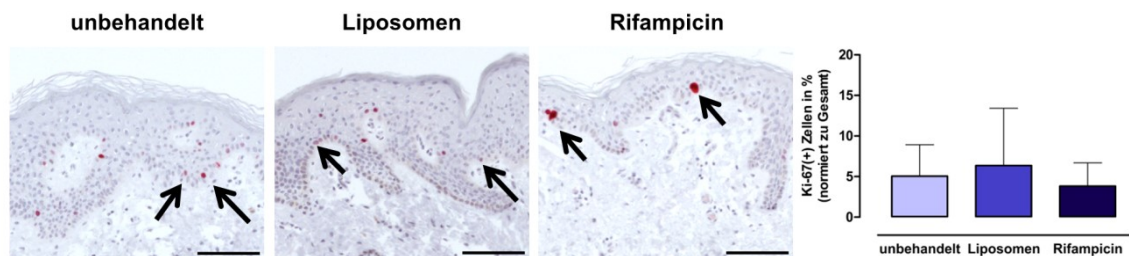
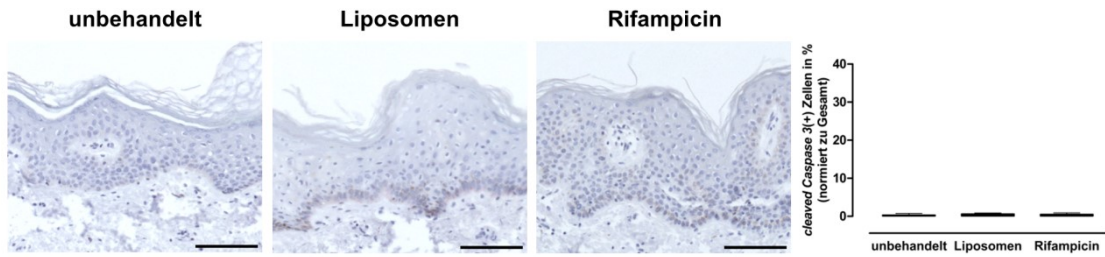


Abbildung 42: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden für 24 h mit unbeladenen Liposomen oder 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Durch immunohistochemischen Nachweis wurden die Explantate mittels Ki-67-Färbung hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten untersucht. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm; schwarze Pfeile = Ki-67(+) Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet.

A) Epidermis



B) Dermis

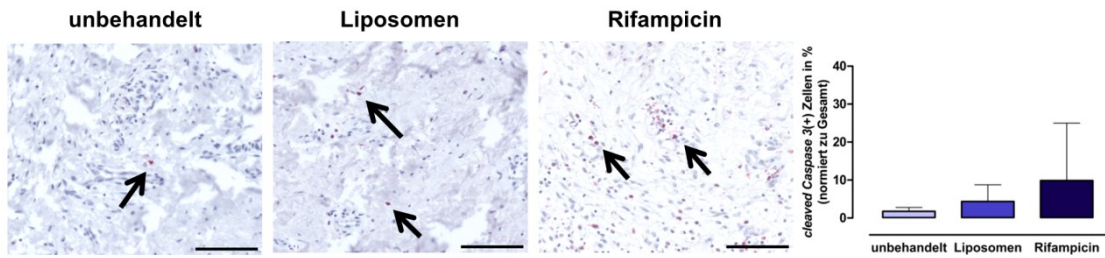


Abbildung 43: Einfluss der Rifampicin-Nanoformulierung auf die Apoptoseinduktion in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden für 24 h mit unbeladenen Liposomen oder 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Für die Beurteilung der A) epidermalen und B) dermalen Apoptoseinduktion in den Epidermismodellen, wurden Schnitte dieser mit einem Anti-*cleaved Caspase 3*-Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative Ausschnitte und die Quantifizierung ist dargestellt als Whisker Boxplot (Epidermis n = 3; Dermis n = 4; Maßstabsbalken = 100 µm; schwarze Pfeile = *cleaved Caspase 3*(+) Zellen). Die P-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test berechnet.

7.6 Immunmodulierende Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung in *ex vivo* Explantaten



Abbildung 44: Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung auf den *Toll-like* Rezeptor 2 in der Epidermis in *ex vivo* Explantaten.

Explantate aus *Hidradenitis suppurativa* wurden für 24 h mit unbeladenen Liposomen oder 0,3 %-igen Rifampicin-Nanoformulierung (Rifampicin) behandelt. Für die Beurteilung der Wirkung der Rifampicin-Nanoformulierung wurden Schnitte dieser mit einem Anti-*Toll-like* Rezeptor 2-Antikörper angefärbt. Gezeigt werden repräsentative (n = 3; Maßstabsbalken = 100 µm).

Literaturverzeichnis

1. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(4):390–401.
2. Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control.* 2006;34(10 SUPPL.):98–110.
3. Brohem CA, Da Silva Cardeal LB, Tiago M, Soengas MS, De Moraes Barros SB, Maria-Engler SS. Artificial skin in perspective: Concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(1):35–50.
4. Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* 2014;32(1):3–13.
5. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol.* 2016;25(2):92–8.
6. Kobayashi T, Naik S, Nagao K. Choreographing Immunity in the Skin Epithelial Barrier. *Immunity.* 2019;50(3):552–65.
7. Lawlor K, Kaur P. Dermal Contributions to Human Interfollicular Epidermal Architecture and Self-Renewal. *Int J Mol Sci.* 25. November 2015;16(12):28098–107.
8. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012;30(3):257–62.
9. Eckert RL, Rorke EA. Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ Health Perspect.* 1989;80:109–16.
10. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11. März 2009;10(3):207–17.
11. Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci.* Februar 2015;77(2):85–92.
12. Karimkhani C, Dellavalle RP, Coffeng LE, Flohr C, Hay RJ, Langan SM, u. a. Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update From the Global Burden of Disease Study 2013. *JAMA Dermatol.* 1. Mai 2017;153(5):406.
13. Hay RJ, Johns NE, Williams HC, Bolliger IW, Dellavalle RP, Margolis DJ, u. a. The Global Burden of Skin Disease in 2010: An Analysis of the Prevalence and Impact of Skin Conditions. *J Invest Dermatol.* Juni 2014;134(6):1527–34.
14. Velpeau AA. No Ti. In: *Dictionnaire de médecine, un repertoire générale des Sciences Médicales sous le rapport théorique et pratique.* 2. Aufl. Bechet, Jeune Z; 1839.
15. Verneuil A. Etudes sur les tumeurs de la peau; de quelques maladies des glandes sudoripares. *Arch Gen Med.* 1854;4.
16. Brunsting HA. Hidradenitis suppurativa: abscess of the apocrine seat glands. *Arch Dermatol Syphiology.* 1939;39:108–20.

17. Plewig G, Steger M. Acne inversa (alias acne triad, acne tetrad or hidradenitis suppurativa). In: Marks R, Plewig G, Herausgeber. Acne and related disorders. London; 1989. S. 345–57.
18. Zouboulis CC, Bechara FG, Fritz K, Kurzen H, Liakou AI, Marsch WC, u. a. [S1 guideline for the treatment of hidradenitis suppurativa / acne inversa * (number ICD-10 L73.2)]. J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG. Oktober 2012;10 Suppl 5(013):S1-31.
19. Wolk K, Join-Lambert O, Sabat R. Aetiology and pathogenesis of hidradenitis suppurativa. Br J Dermatol. 2020;183(6):999–1010.
20. Jemec GBE, Heidenheim M, Nielsen NH. The prevalence of hidradenitis suppurativa and its potential precursor lesions. J Am Acad Dermatol. 1996;35(2 PART 1):191–4.
21. Kirsten N, Petersen J, Hagenström K, Augustin M. Epidemiology of hidradenitis suppurativa in Germany – an observational cohort study based on a multisource approach. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2020;34(1):174–9.
22. Jørgensen AR, Yao Y, Ghazanfar MN, Ring HC, Thomsen SF. Burden , predictors and temporal relationships of comorbidities in patients with hidradenitis suppurativa : a hospital-based cohort study. JEADV. 2019;
23. Kimball AB, Sundaram M, Gauthier G, Guérin A, Pivneva I, Singh R, u. a. The Comorbidity Burden of Hidradenitis Suppurativa in the United States: A Claims Data Analysis. Dermatol Ther. Dezember 2018;8(4):557–69.
24. Pinter A, Kokolakis G, Rech J, Biermann MHC, Häberle BM, Multmeier J, u. a. Hidradenitis Suppurativa and Concurrent Psoriasis: Comparison of Epidemiology, Comorbidity Profiles, and Risk Factors. Dermatol Ther. August 2020;10(4):721–34.
25. Hurley H. Axillary hyperhidrosis, apocrine bromhidrosis, hidradenitis suppurativa, and familial benign pemphigus: surgical approach. In: Roenigk R, Roenink H, Herausgeber. Dermatologic surgery. New York: Marcel Dekker; 1989. S. 729–39.
26. Canoui-Poitaine F, Le Thuaut A, Revuz JE, Viallette C, Gabison G, Poli F, u. a. Identification of Three Hidradenitis Suppurativa Phenotypes: Latent Class Analysis of a Cross-Sectional Study. J Invest Dermatol. Juni 2013;133(6):1506–11.
27. Fitzsimmons JS, Guilbert PR, Fitzsimmons EM. Evidence of genetic factors in hidradenitis suppurativa. Br J Dermatol. 1985;113(1):1–8.
28. Duchatelet S, Miskinyte S, Delage M, Ungeheuer MN, Lam T, Benhadou F, u. a. Low Prevalence of GSC Gene Mutations in a Large Cohort of Predominantly Caucasian Patients with Hidradenitis Suppurativa. J Invest Dermatol. 2020;140(10):2085-2088.e14.
29. Pan Y, Lin MH, Tian X, Cheng HT, Gridley T, Shen J, u. a. γ -Secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. Dev Cell. 2004;7(5):731–43.
30. Yang J, Wang L, Huang Y, Liu K, Lu C, Si N, u. a. Keratin 5-Cre-driven deletion of Ncstn in an acne inversa-like mouse model leads to a markedly increased IL-36a and Sprr2 expression. Front Med. 28. Juni 2020;14(3):305–17.

31. González-Villanueva I, Gutiérrez M, Hispán P, Betlloch I, Pascual J. Novel POFUT1 mutation associated with hidradenitis suppurativa–Dowling–Degos disease firm up a role for Notch signalling in the pathogenesis of this disorder. *Br J Dermatol*. 2018;
32. Vural S, Gündoğdu M, Gökpınar E, Durmaz CD, Vural A, Steinmüller-Magin L, u. a. Association of Pysin mutations and Autoinflammation with complex phenotype hidradenitis suppurativa: a case control study. *Br J Dermatol*. 2019;
33. Sabat R, Chanwangpong A, Schneider-burrus S, Metternich D, Kurek A, Philipp S, u. a. Increased Prevalence of Metabolic Syndrome in Patients with Acne Inversa. *PLoS One*. 2012;7(2).
34. Phan K, Charlton O, Smith SD. Hidradenitis suppurativa and metabolic syndrome – systematic review and adjusted meta-analysis. *Int J Dermatol*. 2019;
35. Kromann CB, Deckers IE, Esmann S, Boer J, Prens EP, Jemec GBE. Risk factors , clinical course and long-term prognosis in hidradenitis suppurativa : a cross-sectional study *. *Br J Dermatol*. 2014;(April 2006):819–24.
36. Koenig A, Lehmann C, Rompel R, Hopple R. Cigarette Smoking as a Triggering Factor of Hidradenitis suppurativa. *Dermatol Surg*. 1999;26:1–4.
37. Kokolakis G, Wolk K, Schneider-Burrus S, Kalus S, Barbus S, Gomis-Kleindienst S, u. a. Delayed Diagnosis of Hidradenitis Suppurativa and Its Effect on Patients and Healthcare System. *Dermatology*. 2020;236(5):421–30.
38. Loget J, Saint-Martin C, Guillem P, Kanagaratnam L, Becherel PA, Nassif A, u. a. Erreur médicale des patients atteints d'hidradénite suppurée : un problème majeur et persistant. Étude « R-ENS Verneuil ». *Ann Dermatol Vénéréologie*. 2018;145(5):331–8.
39. Boer J, Weltevreden EF. Hidradenitis suppurativa or acne inversa. A clinicopathological study of early lesions. *Br J Dermatol*. 1996;135(5):721–5.
40. Jemec GBE, Hansen U. Histology of hidradenitis suppurativa. *J Am Acad Dermatol*. 1996;34(6):994–9.
41. Laffert M von, Helmbold P, Wohlrab J, Fiedler E, Stadie V, Marsch WC. Hidradenitis suppurativa (acne inversa): Early inflammatory events at terminal follicles and at interfollicular epidermis. *Exp Dermatol*. 2010;19(6):533–7.
42. Danby FW, Jemec GBE, Marsch WC, Von Laffert M. Preliminary findings suggest hidradenitis suppurativa may be due to defective follicular support. *Br J Dermatol*. 2013;168(5):1034–9.
43. Kelly G, Hughes R, McGarry T, Van Den Born M, Adamzik K, Fitzgerald R, u. a. Dysregulated cytokine expression in lesional and nonlesional skin in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2015;173(6):1431–9.
44. Witte-Händel E, Wolk K, Tsaousi A, Irmer ML, Mößner R, Shomroni O, u. a. The IL-1 Pathway Is Hyperactive in Hidradenitis Suppurativa and Contributes to Skin Infiltration and Destruction. *J Invest Dermatol*. 2019;139(6):1294–305.
45. Lima AL, Karl I, Giner T, Poppe H, Schmidt M, Presser D, u. a. Keratinocytes and neutrophils are important sources of proinflammatory molecules in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2016;174(3):514–21.

46. 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):691–7.
47. Dajnoki Z, Somogyi O, Medgyesi B, Jenei A, Szabó L, Gáspár K, u. a. Primary alterations during the development of hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021;
48. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;5(SEP):1–8.
49. Liu Y, Yin H, Zhao M, Lu Q. TLR2 and TLR4 in Autoimmune Diseases: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 19. Oktober 2014;47(2):136–47.
50. Borrello S, Nicolò C, Delogu G, Pandolfi F, Ria F. TLR2: A crossroads between infections and autoimmunity? *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24(3):549–56.
51. Penno CA, Jäger P, Laguerre C, Hasler F, Hofmann A, Gass SK, u. a. Lipidomics Profiling of Hidradenitis Suppurativa Skin Lesions Reveals Lipxygenase Pathway Dysregulation and Accumulation of Proinflammatory Leukotriene B4. *J Invest Dermatol.* Dezember 2020;140(12):2421-2432.e10.
52. Sabat R, Jemec GBE, Kimball AB, Prens E, Wolk K. --Hidradenitis suppurativa. *Nat Rev Primer.* 2020;0123456789.
53. Van Der Zee HH, De Ruiter L, Boer J, Van Den Broecke DG, Den Hollander JC, Laman JD, u. a. Alterations in leucocyte subsets and histomorphology in normal-appearing perilesional skin and early and chronic hidradenitis suppurativa lesions. *Br J Dermatol.* 2012;166(1):98–106.
54. Gudjonsson JE, Tsoi LC, Ma F, Billi AC, van Straalen KR, Vossen ARJV, u. a. Contribution of plasma cells and B cells to hidradenitis suppurativa pathogenesis. *JCI Insight.* 2. Oktober 2020;5(19):e139930.
55. Byrd AS, Carmona-Rivera C, O'Neil LJ, Carlucci PM, Cisar C, Rosenberg AZ, u. a. Neutrophil extracellular traps, B cells, and type I interferons contribute to immune dysregulation in hidradenitis suppurativa. *Sci Transl Med.* 2019;11(508):1–13.
56. Mortaz E, Alipoor SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front Immunol.* 2. Oktober 2018;9:2171.
57. Sabat R, Wolk K, Loyal L, Döcke W dietrich, Ghoreschi K. T cell pathology in skin inflammation. *Semin Immunopathol.* 2019;359–77.
58. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:1–12.
59. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity.* Februar 2018;48(2):202–13.
60. Chen Q, Yuan S, Sun H, Peng L. CD3+CD20+ T cells and their roles in human diseases. *Hum Immunol.* März 2019;80(3):191–4.
61. Zhu X, Zhu J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci.* 28. Oktober 2020;21(21):8011.

62. 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):790–8.
63. Hotz C, Boniotto M, Guguin A, Surenaud M, Jean-Louis F, Tisserand P, u. a. Intrinsic Defect in Keratinocyte Function Leads to Inflammation in Hidradenitis Suppurativa. *J Invest Dermatol*. September 2016;136(9):1768–80.
64. Campione E, Lanna C, Diluvio L, Cannizzaro MV, Grelli S, Galluzzo M, u. a. Skin immunity and its dysregulation in atopic dermatitis, hidradenitis suppurativa and vitiligo. *Cell Cycle*. 1. Februar 2020;19(3):257–67.
65. Hessam S, Gambichler T, Höxtermann S, Skrygan M, Sand M, Garcovich S, u. a. Frequency of circulating subpopulations of T-regulatory cells in patients with hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. April 2020;34(4):834–8.
66. Thomi R, Cazzaniga S, Seyed Jafari SM, Schlapbach C, Hunger RE. Association of Hidradenitis Suppurativa With T Helper 1/T Helper 17 Phenotypes: A Semantic Map Analysis. *JAMA Dermatol*. 1. Mai 2018;154(5):592.
67. Hoffman LK, Tomalin LE, Schultz G, Howell MD, Anandasabapathy N, Alavi A, u. a. Integrating the skin and blood transcriptomes and serum proteome in hidradenitis suppurativa reveals complement dysregulation and a plasma cell signature. *De Vita V, Herausgeber. PLOS ONE*. 28. September 2018;13(9):e0203672.
68. Jiménez-Gallo D, de la Varga-Martínez R, Ossorio-García L, Collantes-Rodríguez C, Rodríguez C, Linares-Barrios M. Effects of adalimumab on T-helper-17 lymphocyte- and neutrophil-related inflammatory serum markers in patients with moderate-to-severe hidradenitis suppurativa. *Cytokine*. März 2018;103(September 2017):20–4.
69. Banerjee A, McNish S, Shanmugam VK. Interferon-gamma (IFN- γ) is Elevated in Wound Exudate from Hidradenitis Suppurativa. *Immunol Invest*. 2017;46(2):149–58.
70. van der Zee HH, de Ruyter L, van den Broecke DG, Dik WA, Laman JD, Prens EP. Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: a rationale for targeting TNF- α and IL-1 β . *Br J Dermatol*. Juni 2011;164(6):1292–8.
71. Wolk K, Wenzel J, Tsaousi A, Witte-Händel E, Babel N, Zelenak C, u. a. Lipocalin-2 is expressed by activated granulocytes and keratinocytes in affected skin and reflects disease activity in acne inversa/hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 19. November 2017;177(5):1385–93.
72. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, u. a. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996;183(6):2593–603.
73. Dajnoki Z, Somogyi O, Medgyesi B, Jenei A, Szabó L, Gáspár K, u. a. Primary alterations during the development of hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. März 2022;36(3):462–71.
74. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. September 2009;86(3):557–66.

75. Vossen ARJV, Ardon CB, 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*. 12. August 2019;181(2):314–23.
76. Hänel KH, Cornelissen C, Lüscher B, Baron JM. Cytokines and the skin barrier. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):6720–45.
77. Mozeika E, Pilmane M, Nürnberg B, Jemec G. Tumour Necrosis Factor-alpha and Matrix Metalloproteinase-2 are Expressed Strongly in Hidradenitis Suppurativa. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(3):301–4.
78. Platzer C, Meisel Ch, Vogt K, Platzer M, Volk HD. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor- α and cAMP elevating drugs. *Int Immunol*. 1995;7(4):517–23.
79. Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prösch S. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol*. Oktober 1999;29(10):3098–104.
80. Ring HC, Emtestam L. The Microbiology of Hidradenitis Suppurativa. *Dermatol Clin*. 2016;34(1):29–35.
81. Lapins J, Jarstrand C, Emtestam L. Coagulase-negative staphylococci are the most common bacteria found in cultures from the deep portions of hidradenitis suppurativa lesions, as obtained by carbon dioxide laser surgery. *Br J Dermatol*. 1999;140(1):90–5.
82. Nikolakis G, Liakou AI, Bonovas S, Seltmann H, Bonitsis N, Join-Lambert O, u. a. Bacterial colonization in hidradenitis suppurativa/acne inversa: A cross-sectional study of 50 patients and review of the literature. *Acta Derm Venereol*. 2017;97(4):493–8.
83. Ring HC, Bay L, Nilsson M, Kallenbach K, Miller IM, Saunte DM, u. a. Bacterial biofilm in chronic lesions of hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2017;176(4):993–1000.
84. Ring HC, Bay L, Kallenbach K, Miller IM, Prens E, Saunte DM, u. a. Normal skin microbiota is altered in pre-clinical hidradenitis suppurativa. *Acta Derm Venereol*. 2017;97(2):208–13.
85. Zouboulis CC, Desai N, Emtestam L, Hunger RE, Ioannides D, Juhász I, u. a. European S1 guideline for the treatment of hidradenitis suppurativa/acne inversa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015;29(4):619–44.
86. Gemmell CG, Peterson PK, Schmeling D, Kim Y, Mathews J, Wannamaker L, u. a. Potentiation of Opsonization and Phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* following Growth in the Presence of Clindamycin. *J Clin Invest*. 1. Mai 1981;67(5):1249–56.
87. Schlievert PM, Kelly JA. Clindamycin-Induced Suppression of Toxic-Shock Syndrome-Associated Exotoxin Production. *J Infect Dis*. 1. März 1984;149(3):471–471.
88. Sun J, Shigemi H, Tanaka Y, Yamauchi T, Ueda T, Iwasaki H. Tetracyclines downregulate the production of LPS-induced cytokines and chemokines in THP-1 cells via ERK, p38, and nuclear factor- κ B signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. Dezember 2015;4:397–404.
89. Ziglam HM, Daniels I, Finch RG. Immunomodulating activity of rifampicin. *J Chemother*. 2004;16(4):357–61.

90. Wang X, Grace PM, Pham MN, Cheng K, Strand KA, Smith C, u. a. Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* Juli 2013;27(7):2713–22.
91. Bi W, Zhu L, Wang C, Liang Y, Liu J, Shi Q, u. a. Rifampicin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Brain Res.* 2011;1395:12–20.
92. Nilsson BS. Rifampicin: an immunosuppressant? *Lancet Lond Engl.* 14. August 1971;2(7720):374.
93. Ma K, Chen X, Chen JC, Wang Y, Zhang XM, Huang F, u. a. Rifampicin attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting pathogenic Th17 cells responses. *J Neurochem.* 2016;139(6):1151–62.
94. Kim SK, Kim YM, Yeum CE, Jin SH, Chae GT, Lee SB. Rifampicin inhibits the LPS-induced expression of toll-like receptor 2 via the suppression of NF- κ B DNA-binding activity in RAW 264.7 cells. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2009;13(6):475–82.
95. Mu X, Ubagai T, Kikuchi-Ueda T, Tansho-Nagakawa S, Nakano R, Kikuchi H, u. a. Effects of Erythromycin and Rifampicin on Immunomodulatory Gene Expression and Cellular Function in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Chemotherapy.* 2014;395–401.
96. An N, Song Y, Zhang X, Ci X, Li H, Cao Y, u. a. Pretreatment of mice with rifampicin prolongs survival of endotoxic shock by modulating the levels of inflammatory cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2008;30(3):437–46.
97. Acuña L, Hamadat S, Corbalán NS, González-Lizárraga F, Dos-Santos-Pereira M, Rocca J, u. a. Rifampicin and Its Derivative Rifampicin Quinone Reduce Microglial Inflammatory Responses and Neurodegeneration Induced In Vitro by α -Synuclein Fibrillary Aggregates. *Cells.* 2019;8(8).
98. Schrader AMR, Deckers IE, Van Der Zee HH, Boer J, Prens EP. Hidradenitis suppurativa: A retrospective study of 846 Dutch patients to identify factors associated with disease severity. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71(3):460–7.
99. van der Zee HH, Boer J, Prens EP, Jemec GBE. The Effect of Combined Treatment with Oral Clindamycin and Oral Rifampicin in Patients with Hidradenitis Suppurativa. *Dermatology.* 2009;219(2):143–7.
100. van Straalen KR, Tzellos T, Guillem P, Benhadou F, Cuenca-Barrales C, Daxhelet M, u. a. The efficacy and tolerability of tetracyclines and clindamycin plus rifampicin for the treatment of hidradenitis suppurativa: Results of a prospective European cohort study. *J Am Acad Dermatol.* August 2021;85(2):369–78.
101. Yao Y, Jørgensen A -H. R, Ring HC, Thomsen SF. Effectiveness of clindamycin and rifampicin combination therapy in hidradenitis suppurativa: a 6-month prospective study. *Br J Dermatol.* März 2021;184(3):552–3.
102. Kimball AB, Okun MM, Williams DA, Gottlieb AB, Papp KA, Zouboulis CC, u. a. Two Phase 3 Trials of Adalimumab for Hidradenitis Suppurativa. *N Engl J Med.* 4. August 2016;375(5):422–34.

103. Bechara FG, Podda M, Prens EP, Horváth B, Giamarellos-Bourboulis EJ, Alavi A, u. a. Efficacy and Safety of Adalimumab in Conjunction With Surgery in Moderate to Severe Hidradenitis Suppurativa: The SHARPS Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg.* 1. November 2021;156(11):1001.
104. Albrecht J, Baine PA, Ladizinski B, Jemec GB, Bigby M. Long-term clinical safety of clindamycin and rifampicin combination for the treatment of hidradenitis suppurativa. A Critically Appraised Topic. *Br J Dermatol.* April 2019;180(4):749–55.
105. Caposiena Caro RD, Cannizzaro MV, Botti E, Di Raimondo C, Di Matteo E, Gaziano R, u. a. Clindamycin versus clindamycin plus rifampicin in hidradenitis suppurativa treatment: Clinical and ultrasound observations. *J Am Acad Dermatol.* Mai 2019;80(5):1314–21.
106. Maggi N, Pasqualucci CR, Ballotta R, Sensi P. Rifampicin: A New Orally Active Rifamycin. *Chemotherapy.* 1966;11(5):285–92.
107. Hartmann G, Honikel KO, Knüsel F, Nüesch J. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifampicin. *Biochim Biophys Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth.* Oktober 1967;145(3):843–4.
108. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, u. a. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell.* 2001;104(6):901–12.
109. Tsankov N, Angelova I. Rifampin in dermatology. *Clin Dermatol.* 2003;21(1):50–5.
110. Furesz S. Chemical and biological properties of rifampicin. *Antibiot Chemother.* 1970;16:316–51.
111. Schaberg T, Bauer T, Brinkmann F, Diel R, Feiterna-Sperling C, Haas W, u. a. S2k-Leitlinie: Tuberkulose im Erwachsenenalter. *Pneumologie.* 26. Juni 2017;71(06):325–97.
112. WHO. Consolidated Guidelines on Tuberculosis Treatment - Modul 1: Prevention. Who. 2020. 99 S.
113. WHO. Consolidated Guidelines on Tuberculosis Treatment - Modul 4: Treatment. Who. 2020. 99 S.
114. Van Ingen J, Hoefsloot W, Mouton JW, Boeree MJ, Van Soolingen D. Synergistic activity of rifampicin and ethambutol against slow-growing nontuberculous mycobacteria is currently of questionable clinical significance. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(1):80–2.
115. Bittner MJ, Preheim LC. Other Slow-Growing Nontuberculous Mycobacteria. *Microbiol Spectr.* 2016;4:1–9.
116. Basille D, Jounieaux V, Andréjak C. Treatment of Other Nontuberculous Mycobacteria. *Semin Respir Crit Care Med.* 2018;39(3):377–82.
117. Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. *Actas Dermo-Sifiliográficas Engl Ed.* September 2013;104(7):554–63.

118. Mungroo MR, Khan NA, Siddiqui R. Mycobacterium leprae: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Microb Pathog.* 2020;149(June):104475.
119. Khuri Bulos N. Meningococcal Meningitis Following Rifampin Prophylaxis. *Am J Dis Child.* 1973;126(5):689–91.
120. Kimmel SR. Prevention of Meningococcal Disease Physician 2005 ; 72 : 2049-56 . Copyright © 2005 American Academy of Family Physicians .). *Am Fam Physician.* 2005;72(10).
121. Acocella G. Clinical Pharmacokinetics of Rifampicin. *Clin Pharmacokinet.* 1978;3(2):108–27.
122. Barza M. Pharmacokinetics of antibiotics in shallow and deep compartments. *J Antimicrob Chemother.* 1993;31:17–27.
123. Boeree MJ, Heinrich N, Aarnoutse R, Diacon AH, Dawson R, Rehal S, u. a. High-dose rifampicin, moxifloxacin, and SQ109 for treating tuberculosis: a multi-arm, multi-stage randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(1):39–49.
124. Pichard L, Fabre I, Fabre G, Domergue J, Saint Aubert B, Mourad G, u. a. Cyclosporin A drug interactions. Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes. *Drug Metab Disposition.* 1990;595–606.
125. Kolars JC, Schmiedlin-ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of Rifampin-inducible P450111A4 (CYP3A4) in Human Small Bowel Enterocytes. *J Clin Invest.* 1871;4(90):1871–8.
126. Rae JM, Johnson MD, Lippman ME, Flockhart DA. Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. *J Pharmacol Exp Ther.* Dezember 2001;299(3):849–57.
127. Lehmann JM, Mckee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The Human Orphan Nuclear Receptor PXR Is Activated by Compounds That Regulate CYP3A4 Gene Expression and Cause Drug Interactions. *J Clin Invest.* 1998;102:1016–23.
128. Porras AG, Gertz B, Buschmeier A, Constanzer M, Gumbs C, Gottesdiener K, u. a. The effects of metabolic induction by rifampin (Rf) on the elimination of celecoxib (CXB) and the effect of CXB on CYP2D6 metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;
129. Fromm MF, Eckhardt K, Li S, Schanzle G, Hofmann U, Mikus G, u. a. Loss of analgesic effect of morphine due to coadministration of rifampin. *Pain.* 1997;72(1–2):261–7.
130. Foster DJR, Somogyi AA, Bochner F. Methadone N-demethylation in human liver microsomes: Lack of stereoselectivity and involvement of CYP3A4. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;47(4):403–12.
131. Prescott L, Critchley J, Balali-Mood M, Pentland B. Effects of microsomal enzyme induction on paracetamol metabolism in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1981;12(2):149–53.
132. Cheng J, Ma X, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Rifampicin-Activated Human Pregnane X Receptor and CYP3A4 Induction Enhance Acetaminophen-Induced Toxicity □ ABSTRACT : *Drug Metab Disposition.* 2009;37(8):1611–21.

133. Self T, Corley CR, Nabhan S, Abell T. Case report: interaction of rifampicin and nortriptyline. *Am J Med Sci.* 1996;80–1.
134. Rajasingham R, Meya DB, Boulware DR. Are fluconazole or sertraline dose adjustments necessary with concomitant rifampin? *HIV Med.* 2019;19(6):2018–20.
135. Zilly W, Breimer DD, Richter E. Induction of drug metabolism in man after rifampicin treatment measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance. *Eur J Clin Pharmacol.* 1975;9(2–3):219–27.
136. Park JY, Kim KA, Park PW, Park CW, Shin JG. Effect of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;74(4):334–40.
137. te Brake LHM, Yunivita V, Livia R, Soetedjo N, van Ewijk-Beneken Kolmer E, Koenderink JB, u. a. Rifampicin Alters Metformin Plasma Exposure but Not Blood Glucose Levels in Diabetic Tuberculosis Patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105(3):730–7.
138. Niemi M, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of nateglinide in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;427–32.
139. Niemi M, Backman JT, Neuvonen M. Rifampin decreases the plasma concentrations and effects of repaglinide. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;495–500.
140. Scheen AJ. Dipeptidylpeptidase-4 Inhibitors (Gliptins). *Clin Pharmacokinet.* September 2010;49(9):573–88.
141. Kandiah D, Penny WJ, Fraser AG, Lewis MJ. A Possible Drug Interaction Between Rifampicin and Enalapril. *Eur J Clin Pharmacol.* 1988;431–2.
142. Williamson KM, Patterson JH, McQueen RH, Adams KF, Pieper JA. Effects of erythromycin or rifampin on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* März 1998;63(3):316–23.
143. Kirch W, Rose I, Klingmann I, Pabst J, Ohnhaus EE. Interaction of bisoprolol with cimetidine and rifampicin. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986;31(1):59–62.
144. Lilja JJ, Juntti-Patinen L, Neuvonen PJ. Effect of Rifampicin on the Pharmacokinetics of Atenolol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* Juni 2006;98(6):555–8.
145. Barbarash RA. Verapamil-Rifampin Interaction. *Drug Intell Clin Pharm.* 30. Juli 1985;19(7–8):559–60.
146. Tada Y, Tsuda Y, Otsuka T, Nagasawa K, Kimura H, Kusaba T, u. a. Case Report: Nifedipine-Rifampicin Interaction Attenuates the Effect on Blood Pressure in a Patient with Essential Hypertension. *Am J Med Sci.* Januar 1992;303(1):25–7.
147. Kyrklund C, Backman JT, Kivistö KT, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen PJ. Rifampin greatly reduces plasma simvastatin and simvastatin acid concentrations. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(6):592–7.
148. Oswald S, Haenisch S, Fricke C, Sudhop T, Remmler C, Giessmann T, u. a. Intestinal expression of P-glycoprotein (ABCB1), multidrug resistance associated protein 2

- (ABCC2), and uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 predicts the disposition and modulates the effects of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79(3):206–17.
149. McAllister WC, Thompson PJ, Al-Habet SM, Rogers HJ. Rifampicin reduces effectiveness and bioavailability of prednisolone. *Br Med J Clin Res Ed.* 1983;286(March):923–5.
150. Back DJ, Breckenridge AM, Crawford F, Maciver M, Orme MLE, Park BK, u. a. The Effect of Rifampicin on Norethisterone Pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979;197:193–7.
151. LeBel M, Masson E, Guilbert E, Colborn D, Paquet F, Allard S, u. a. Effects of Rifabutin and Rifampicin on the Pharmacokinetics of Ethinylestradiol and Norethindrone. *J Clin Pharmacol.* 1998;438:1042–50.
152. Jones D, Banerjee A, Berger PZ, Gross A, McNish S, Amdur R, u. a. Inherent differences in keratinocyte function in hidradenitis suppurativa: Evidence for the role of IL-22 in disease pathogenesis. *Immunol Invest.* 2018;47(1):57–70.
153. Tsaousi A, Witte E, Witte K, Röwert-Huber HJ, Volk HD, Sterry W, u. a. MMP8 Is Increased in Lesions and Blood of Acne Inversa Patients: A Potential Link to Skin Destruction and Metabolic Alterations. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:1–8.
154. Sanchez J, Le Jan S, Muller C, François C, Renard Y, Durlach A, u. a. Matrix remodelling and MMP expression/activation are associated with hidradenitis suppurativa skin inflammation. *Exp Dermatol.* 14. Mai 2019;28(5):593–600.
155. Garg A, Neuren E, Cha D, Kirby JS, Ingram JR, Jemec GBE, u. a. Evaluating patients' unmet needs in hidradenitis suppurativa: Results from the Global Survey Of Impact and Healthcare Needs (VOICE) Project. *J Am Acad Dermatol.* Februar 2020;82(2):366–76.
156. Prens LM, Bouwman K, Troelstra LD, Prens EP, Alizadeh BZ, Horváth B. New insights in hidradenitis suppurativa from a population-based Dutch cohort: prevalence, smoking behaviour, socioeconomic status and comorbidities*. *Br J Dermatol.* Mai 2022;186(5):814–22.
157. Mateu R, Živicová V, Krejčí ED, Grim M, Strnad H, Vlček Č, u. a. Functional differences between neonatal and adult fibroblasts and keratinocytes: Donor age affects epithelial-mesenchymal crosstalk in vitro. *Int J Mol Med.* Oktober 2016;38(4):1063–74.
158. Randall MJ, Jüngel A, Rimann M, Wuertz-Kozak K. Advances in the biofabrication of 3D skin in vitro: Healthy and pathological models. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6(OCT).
159. Companjen AR, Wei L, Laman JD, Prens EP. A modified ex vivo skin organ culture system for functional studies. *Arch Dermatol Res.* 2001;184–90.
160. Sidgwick GP, McGeorge D, Bayat A. Functional testing of topical skin formulations using an optimised ex vivo skin organ culture model. *Arch Dermatol Res.* 2016;308(5):297–308.
161. Bäckvall H, Wassberg C, Berne B, Fredrik P, Uv S, Bäckvall H, u. a. Similar UV responses are seen in a skin organ culture as in human skin in vivo. *Exp Dermatol.* 2002;11:349–56.

162. Zouboulis CC. Ex vivo human models of hidradenitis suppurativa/acne inversa for laboratory research and drug screening. *Br J Dermatol.* 18. August 2019;181(2):244–6.
163. Scala E, Caprio R Di, Cacciapuoti S, Caiazza G, Fusco A, Tortorella E, u. a. A new T helper 17 cytokine in hidradenitis suppurativa : antimicrobial and proinflammatory role of interleukin-26. *Br J Dermatol.* 2019;1–8.
164. Eberlin S, Silva MS da, Facchini G, Silva GH da, Pinheiro ALTA, Eberlin S, u. a. The *Ex Vivo* Skin Model as an Alternative Tool for the Efficacy and Safety Evaluation of Topical Products. *Altern Lab Anim.* Januar 2020;48(1):10–22.
165. van der Zee HH, Laman JD, Prens EP. Can Animal Skin Diseases or Current Transgenic Mice Serve as a Model for Hidradenitis Suppurativa? *Dermatology.* 2012;225(1):9–13.
166. Quartey QQ, Miller RJ, Pinsker BL, Okoh UJ, Shipman WD, George BA, u. a. Lessons learned from the development of a hidradenitis suppurativa xenograft mouse model. *Clin Exp Dermatol.* März 2020;45(2):202–6.
167. Danso MO, van Drongelen V, Mulder A, van Esch J, Scott H, van Smeden J, u. a. TNF- α and Th2 Cytokines Induce Atopic Dermatitis–Like Features on Epidermal Differentiation Proteins and Stratum Corneum Lipids in Human Skin Equivalents. *J Invest Dermatol.* Juli 2014;134(7):1941–50.
168. Clarysse K, Pfaff CM, Marquardt Y, Huth L, Kortekaas Krohn I, Kluwig D, u. a. JAK1/3 inhibition preserves epidermal morphology in full-thickness 3D skin models of atopic dermatitis and psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* Februar 2019;33(2):367–75.
169. Gazel A, Rosdy M, Bertino B, Tornier C, Sahuc F, Blumenberg M. A Characteristic Subset of Psoriasis-Associated Genes Is Induced by Oncostatin-M in Reconstituted Epidermis. *J Invest Dermatol.* Dezember 2006;126(12):2647–57.
170. Hennies HC, Poumay Y. Skin Disease Models In Vitro and Inflammatory Mechanisms: Predictability for Drug Development. *Handb Exp Pharmacol.* 2021;265:187–218.
171. Schell SL, Cong Z, Sennett ML, Gettle SL, Longenecker AL, Goldberg SR, u. a. Keratinocytes and immune cells in the epidermis are key drivers of inflammation in hidradenitis suppurativa providing a rationale for novel topical therapies. *Br J Dermatol.* 22. Februar 2023;188(3):407–19.
172. Dmitriev A, König A, Lang V, Diehl S, Kaufmann R, Pinter A, u. a. mTORC1 – a potential player in the pathogenesis of hidradenitis suppurativa? *J Eur Acad Dermatol Venereol* [Internet]. Juli 2021 [zitiert 12. Mai 2022];35(7). Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdv.17202>
173. Niehues H, Bouwstra JA, El Ghalbzouri A, Brandner JM, Zeeuwen PLJM, van den Bogaard EH. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Exp Dermatol.* 2018;27(5):501–11.
174. Buche P, Violin L, Girard P. Evaluation of the effects of cosmetic or dermo-pharmaceutical products on cutaneous energy metabolism using the Episkin model of reconstructed epidermis. *Cell Biol Toxicol.* Dezember 1994;10(5–6):381–5.
175. Welss T, Basketter DA, Schröder KR. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro.* Juni 2004;18(3):231–43.

176. Scholl L, Hessam S, Reitenbach S, Bechara FG. Surgical treatment options for hidradenitis suppurativa/acne inversa. *Hautarzt*. 2018;69(2):149–61.
177. Frew JW, Pigué V. Ex Vivo Models and Interpretation of Mechanistic Studies in Hidradenitis Suppurativa. *J Invest Dermatol*. Juli 2020;140(7):1323–6.
178. van der Zee HH, Laman JD, Prens EP. Can Animal Skin Diseases or Current Transgenic Mice Serve as a Model for Hidradenitis Suppurativa?. *Dermatology*. 2012;225(1):9–13.
179. Wallenwein CM, Ashtikar M, Hofhaus G, Haferland I, Thurn M, König A, u. a. How wound environments trigger the release from Rifampicin-loaded liposomes. *Int J Pharm*. Februar 2023;633:122606.
180. Borowczyk J, Buerger C, Tadjrischi N, Drukala J, Wolnicki M, Wnuk D, u. a. IL-17E (IL-25) and IL-17A Differentially Affect the Functions of Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. Juli 2020;140(7):1379-1389.e2.
181. Jean J, Lapointe M, Soucy J, Pouliot R. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J Dermatol Sci*. Januar 2009;53(1):19–25.
182. Laffert M von, Helmbold P, Wohlrab J, Fiedler E, Stadie V, Marsch WC. Hidradenitis suppurativa (acne inversa): early inflammatory events at terminal follicles and at interfollicular epidermis*: Bi-located inflammation in HS. *Exp Dermatol*. 29. Juli 2009;19(6):533–7.
183. von Laffert M, Stadie V, Wohlrab J, Marsch WC. Hidradenitis suppurativa/acne inversa: bilocated epithelial hyperplasia with very different sequelae: HS with bilocated epithelial hyperplasia. *Br J Dermatol*. Februar 2011;164(2):367–71.
184. Nisar S, Roberson JL, Carney BC, Alkhalil A, Moffatt LT, Shupp JW. Further Histological and Cellular Characterization of Hidradenitis Suppurativa in 11 Patients. *Eplasty*. 2019;19:e21.
185. Navrazhina K, Frew JW, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Garcet S, Krueger JG. Epithelialized tunnels are a source of inflammation in hidradenitis suppurativa. *J Allergy Clin Immunol*. Juni 2021;147(6):2213–24.
186. Furue M. Regulation of Filaggrin, Loricrin, and Involucrin by IL-4, IL-13, IL-17A, IL-22, AHR, and NRF2: Pathogenic Implications in Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci*. 29. Juli 2020;21(15):5382.
187. Ekman AK, Bivik Eding C, Rundquist I, Enerbäck C. IL-17 and IL-22 Promote Keratinocyte Stemness in the Germinative Compartment in Psoriasis. *J Invest Dermatol*. Juli 2019;139(7):1564-1573.e8.
188. 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*. April 2002;30(2):131–6.
189. Kurzen, Jung, Hartschuh, Moll, Franke, Moll. Forms of epithelial differentiation of draining sinus in acne inversa (hidradenitis suppurativa): EPITHELIAL DIFFERENTIATION OF SINUSES IN ACNE INVERSA. *Br J Dermatol*. August 1999;141(2):231–9.

190. van der Zee HH, de Ruiter L, Boer J, van den Broecke DG, den Hollander JC, Laman JD, u. a. Alterations in leucocyte subsets and histomorphology in normal-appearing perilesional skin and early and chronic hidradenitis suppurativa lesions: HS histomorphology and leucocyte subsets. *Br J Dermatol*. Januar 2012;166(1):98–106.
191. van der Zee HH, de Ruiter L, van den Broecke DG, Dik WA, Laman JD, Prens EP. Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: a rationale for targeting TNF- α and IL-1 β : Elevated TNF- α , IL-1 β and IL-10 in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. Juni 2011;164(6):1292–8.
192. Hou X, Hossini AM, Nikolakis G, Balthasar O, Kurtz A, Zouboulis CC. 3D-SeboSkin Model for Human ex vivo Studies of Hidradenitis Suppurativa/Acne Inversa. *Dermatology*. 2022;238(2):236–43.
193. van der Zee HH, Laman JD, de Ruiter L, Dik WA, Prens EP. Adalimumab (antitumour necrosis factor- α) treatment of hidradenitis suppurativa ameliorates skin inflammation: an in situ and ex vivo study: Adalimumab ameliorates inflammation in HS. *Br J Dermatol*. Februar 2012;166(2):298–305.
194. Nikolakis G, Seltmann H, Hossini AM, Makrantonaki E, Knolle J, Zouboulis CC. *Ex vivo* human skin and SZ95 sebocytes exhibit a homeostatic interaction in a novel coculture contact model. *Exp Dermatol*. Juli 2015;24(7):497–502.
195. Kleszczyński K, Fischer TW. Development of a short-term human full-thickness skin organ culture model in vitro under serum-free conditions. *Arch Dermatol Res*. September 2012;304(7):579–87.
196. Elmets CA, Korman NJ, Prater EF, Wong EB, Rupani RN, Kivelevitch D, u. a. Joint AAD–NPF Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapy and alternative medicine modalities for psoriasis severity measures. *J Am Acad Dermatol*. Februar 2021;84(2):432–70.
197. Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, u. a. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. Mai 2018;32(5):657–82.
198. Cui M, Wiraja C, Chew SWT, Xu C. Nanodelivery Systems for Topical Management of Skin Disorders. *Mol Pharm*. 1. Februar 2021;18(2):491–505.
199. Jindal S, Awasthi R, Singhare D, Kulkarni GT. Topical delivery of Tacrolimus using liposome containing gel: An emerging and synergistic approach in management of psoriasis. *Med Hypotheses*. September 2020;142:109838.
200. Marques MRC, Choo Q, Ashtikar M, Rocha TC, Bremer-Hoffmann S, Wacker MG. Nanomedicines - Tiny particles and big challenges. *Adv Drug Deliv Rev*. November 2019;151–152:23–43.
201. Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. *Int J Pharm*. September 2006;322(1–2):60–6.
202. Yang J, Bahreman A, Daudey G, Bussmann J, Olsthoorn RCL, Kros A. Drug Delivery via Cell Membrane Fusion Using Lipopeptide Modified Liposomes. *ACS Cent Sci*. 28. September 2016;2(9):621–30.

203. Maione-Silva L, de Castro EG, Nascimento TL, Cintra ER, Moreira LC, Cintra BAS, u. a. Ascorbic acid encapsulated into negatively charged liposomes exhibits increased skin permeation, retention and enhances collagen synthesis by fibroblasts. *Sci Rep*. Dezember 2019;9(1):522.
204. Moldovan M, Leucuta SE, Bakri A. Preparation, in vitro release and skin absorption of hydrocortisone acetate from a liposome gel. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2006;16(2):127–32.
205. Calienni MN, Febres-Molina C, Llovera RE, Zevallos-Delgado C, Tuttolomondo ME, Paolino D, u. a. Nanoformulation for potential topical delivery of Vismodegib in skin cancer treatment. *Int J Pharm*. Juni 2019;565:108–22.
206. Singh H, Jindal S, Singh M, Sharma G, Kaur IP. Nano-formulation of rifampicin with enhanced bioavailability: Development, characterization and in-vivo safety. *Int J Pharm*. Mai 2015;485(1–2):138–51.
207. Holthaus L, Lamp D, Gavrisan A, Sharma V, Ziegler AG, Jastroch M, u. a. CD4+ T cell activation, function, and metabolism are inhibited by low concentrations of DMSO. *J Immunol Methods*. Dezember 2018;463:54–60.
208. Ferik P, Dariš B. The influence of dimethyl sulfoxide (DMSO) on metabolic activity and morphology of melanoma cell line WM-266-4. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr*. 30. August 2018;64(11):41–3.
209. Bi W, Zhu L, Jing X, Zeng Z, Liang Y, Xu A, u. a. Rifampicin improves neuronal apoptosis in LPS-stimulated co-cultured BV2 cells through inhibition of the TLR-4 pathway. *Mol Med Rep*. 2014;10(4):1793–9.
210. Zhang Z, Wang X, Luo F, Yang H, Hou T, Zhou Q, u. a. Effects of rifampicin on osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells in the bone marrow. *Genet Mol Res*. 2014;13(3):6398–410.
211. Wang X, Grace PM, Pham MN, Cheng K, Strand KA, Smith C, u. a. Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. *FASEB J*. Juli 2013;27(7):2713–22.
212. Maas-Szabowski N, Stark È, Fusenig NE. Keratinocyte Growth Regulation in Defined Organotypic Cultures Through IL-1-Induced Keratinocyte Growth Factor Expression in Resting Fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2000;107:5–84.
213. Peramo A, Marcelo CL. Visible effects of rapamycin (sirolimus) on human skin explants in vitro. *Arch Dermatol Res*. März 2013;305(2):163–71.
214. Pereira MN, Tolentino S, Pires FQ, Anjos JLV, Alonso A, Gratieri T, u. a. Nanostructured lipid carriers for hair follicle-targeted delivery of clindamycin and rifampicin to hidradenitis suppurativa treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces*. Januar 2021;197:111448.
215. Tsankov N, Grozdev I. Rifampicin – A mild immunosuppressive agent for psoriasis. *J Dermatol Treat*. April 2011;22(2):62–4.
216. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci*. 28. November 2019;20(23):6008.

217. Abbas AK, Trotta E, R. Simeonov D, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol*. 20. Juli 2018;3(25):eaat1482.
218. Carmona-Rivera C, O'Neil LJ, Patino-Martinez E, Shipman WD, Zhu C, Li QZ, u. a. Autoantibodies Present in Hidradenitis Suppurativa Correlate with Disease Severity and Promote the Release of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *J Invest Dermatol*. März 2022;142(3):924–35.
219. Ross Y, Ballou S. Association of hidradenitis suppurativa with autoimmune disease and autoantibodies. *Rheumatol Adv Pract*. 6. Mai 2022;6(2):rkab108.
220. Garcovich S, Maurelli M, Gisondi P, Peris K, Yosipovitch G, Girolomoni G. Pruritus as a Distinctive Feature of Type 2 Inflammation. *Vaccines*. 23. März 2021;9(3):303.
221. Matusiak ♦, Szczęch J, Kaaz K, Lelonek E, Szepietowski J. Clinical Characteristics of Pruritus and Pain in Patients with Hidradenitis Suppurativa. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(2):191–4.
222. Rancan F, Guo X, Rajes K, Sidiropoulou P, Zabihi F, Hoffmann L, u. a. Topical Delivery of Rapamycin by Means of Microenvironment-Sensitive Core-Multi-Shell Nanocarriers: Assessment of Anti-Inflammatory Activity in an ex vivo Skin/T Cell Co-Culture Model. *Int J Nanomedicine*. Oktober 2021;Volume 16:7137–51.
223. Pogo BGT. SPECIFIC INHIBITION BY RIFAMPICIN OF TRANSCRIPTION IN HUMAN LYMPHOCYTES STIMULATED BY PHYTOHEMAGGLUTININ. *J Cell Biol*. 1. November 1972;55(2):515–9.
224. Dubrac S, Elentner A, Ebner S, Horejs-Hoek J, Schmuth M. Modulation of T Lymphocyte Function by the Pregnane X Receptor. *J Immunol*. 15. März 2010;184(6):2949–57.
225. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. März 2013;13(3):159–75.
226. Spisani S, Traniello S, Martuccio C, Rizzuti O, Cellai L. Rifamycins inhibit human neutrophil functions: new derivatives with potential antiinflammatory activity. *Inflammation*. 1997;21(4):391–400.
227. Calleja C, Pascussi JM, Mani JC, Maurel P, Vilarem MJ. The antibiotic rifampicin is a nonsteroidal ligand and activator of the human glucocorticoid receptor. *Nat Med*. Januar 1998;4(1):92–6.
228. Vanlaerhoven AMJD, Ardon CB, Van Straalen KR, Vossen ARJV, Prens EP, Van Der Zee HH. Hurley III hidradenitis suppurativa has an aggressive disease course. *Dermatology*. 2018;234(5–6):232–3.

Publikationsliste

Publikationen/ Vorträge aus dieser Arbeit

Poster:

47. Jahrestagung der ADF, Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, virtuell
03/2021

Rifampicin in Hidradenitis suppurativa

48. Jahrestagung der ADF, Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, virtuell
02/2022

Hidradenitis suppurativa-like reconstructed epidermal equivalents

DPhG Jahrestagung, Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft e.V.
09/2022

Immunomodulating effects of Rifampicin in an ex vivo culture model of Hidradenitis Suppurativa

12th Conference of the EHSF, European Hidradenitis Suppurativa Foundation e.V.
02/2023

Hidradenitis suppurativa-like epidermis model

Vorträge:

11th Conference of the EHSF, European Hidradenitis Suppurativa Foundation e.V.
02/2022

Anti-inflammatory effects of Rifampicin in an ex vivo culture model of Hidradenitis Suppurativa

Publikationen:

I. Haferland, C.M. Wallenwein, T. Ickelsheimer, S. Diehl, M.G. Wacker, S. Schiffmann, C. Buerger, R. Kaufmann, A. Koenig, A. Pinter
„Mechanism of anti-inflammatory effects of Rifampicin in an ex vivo culture system of Hidradenitis Suppurativa”

C.M. Wallenwein, M. Ashtikar, G. Hofhaus, I. Haferland, M. Thurn, A. Koenig, A. Pinter, J. Dressman, M.G. Wacker
„How Wound Environments Trigger the Release from Rifampicin-loaded Liposomes”

I. Haferland, A. Pinter, T. Rossmannith, S. Diehl, C. Buerger, T. Ickelsheimer, R. Kaufmann, A. Koenig
„A novel Epidermis Model using primary Hidradenitis suppurativa keratinocytes”

Erklärung Eigenleistung Dissertation

Except where stated otherwise by reference or acknowledgment, the work presented was generated by myself under the supervision of my advisors during my doctoral studies.

Whenever a figure, table or text is identical to a previous publication, it is stated explicitly in the thesis that copyright permission and/or co-author agreement has been obtained.

The following parts of the thesis have been previously published:

- Chapters
 - 3.1.1 Epidermale Differenzierung bei *Hidradenitis suppurativa*
 - 3.1.2 *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle
 - 3.2.2 Immunmodulierende Wirkung einer Rifampicinbehandlung
 - 4.1.1 *Hidradenitis suppurativa* Epidermismodelle
 - 4.2.3 Immunmodulierende Wirkung und Wirksamkeit von Rifampicin
- Figures
 - Abb. 10: Epidermale Differenzierung von nicht entzündlichen und läSIONalen *Hidradenitis suppurativa* Biopsien.
 - Abb. 11: Epidermale Differenzierung der Epidermismodelle aus *Präputium* und *Hidradenitis suppurativa*.
 - Abb. 12: Inflammatorisches Profil der Epidermismodelle aus *Präputium* und *Hidradenitis suppurativa*.
 - Abb. 17: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf die Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 β Ausschüttung von *ex vivo* Explantaten gemessen mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*.
 - Abb. 18: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf die Tumornekrosefaktor und Interleukin-1 β Ausschüttung von *ex vivo* Explantaten gemessen mittels *Cytometric Bead Assay*.
 - Abb. 19: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf die Interleukin-6, Interleukin-8 und Interleukin-10 Ausschüttung von *ex vivo* Explantaten.
 - Abb. 20: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf Tumornekrosefaktor- α (+), Interleukin-1 β (+) und Interleukin-8(+) Zellen im *Stratum papillare* der Dermis von *ex vivo* Explantaten.
 - Abb. 21: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf CD3(+)-T-Zellen im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.
 - Abb. 23: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf neutrophile Granulozyten im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.
 - Abb. 24: Wirkung einer Rifampicinbehandlung auf Toll-like Rezeptor 2(+) Zellen im *Stratum papillare* der Dermis in *ex vivo* Explantaten.
 - Abb. 33: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Morphologie von nicht entzündlichen und *Hidradenitis suppurativa ex vivo* Explantaten.
 - Abb. 34: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten in *ex vivo* Explantaten aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa*.
 - Abb. 35: Einfluss einer Rifampicinbehandlung auf die Apoptoseinduktion in der Epidermis von *ex vivo* Explantaten aus nicht entzündlicher Haut und *Hidradenitis suppurativa*.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle Stellen, die ich wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen genommen habe, sind als solche kenntlich gemacht. Außerdem habe ich mich auch keiner anderen als der angegebenen Literatur oder sonstiger Hilfsmittel bedient. Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht worden.

Ort, Datum

Unterschrift