

Aus dem Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Etablierung von APC-Zelllinien zur Identifikation
potentieller Autoantigene von CD8+ T-Zellen bei
Autoimmunerkrankungen am Beispiel der Psoriasis vulgaris

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Buttgerit

aus Staaken

Datum der Promotion: 26. Februar 2016

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Abstrakt (Deutsch)	1
1.2 Abstrakt (Englisch)	2
2 Einleitung	4
2.1 Autoimmunerkrankungen: Wenn der Körper sich selbst angreift	4
2.2 Die Komponenten und Funktionen des Immunsystems und deren Rolle bei Autoimmunerkrankungen	5
2.2.1 Überblick über den Aufbau und die Funktionsweise des Immunsystems	5
2.2.2 T-Zellen erkennen prozessierte Antigene über MHC-Komplexe	7
2.2.3 Die Aktivierung von T-Zellen	8
2.2.4 CD137 (4-1BB) - ein Marker für antigenspezifische CD8+ T-Zellen	9
2.2.5 Mechanismen der Selbsttoleranz und Hypothesen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen	10
2.3 Psoriasis vulgaris - eine durch T-Zellen vermittelte Hauterkrankung mit genetischer Disposition	12
2.3.1 Klinisches Erscheinungsbild und Verbreitung der Psoriasis vulgaris	12
2.3.2 Genetische Aspekte der Psoriasis	13
2.3.3 Provokationsfaktoren	14
2.4 Die Immunpathogenese der Psoriasis vulgaris	14
2.4.1 Die Rolle von CD4+ und CD8+ T-Zellen bei der Erkennung potentieller Autoantigene in der Psoriasis vulgaris	15
3 Herleitung der Aufgabenstellung und Zielstellungen dieser Arbeit ..	19
4 Material und Methoden	22
4.1 Material	22
4.1.1 Labormaterialien	22
4.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien	22
4.1.3 Puffer und Lösungen	23
4.1.4 Geräte	24

4.1.5 Enzyme	25
4.1.6 Antigene und Reporter	25
4.1.7 Expressionsvektoren	25
4.1.8 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion	28
4.1.9 Primer zur Sequenzierung	28
4.1.10 Angaben zur verwendeten Zelllinie	29
4.1.11 Antikörper für die Durchflusszytometrie	29
4.2 Methoden	30
4.2.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	30
4.2.2 Restriktionsverdau	30
4.2.3 Transformation von Plasmiden in kompetente E.coli	31
4.2.4 Gelelektrophorese	31
4.2.5 Polymerase-Kettenreaktion	32
4.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten	33
4.2.7 Kultivierung von Zellen	34
4.2.7.1 Einfrieren und Auftauen der T1 Zelllinien	34
4.2.7.2 Zellkulturbedingungen	34
4.2.8 Bestimmung der Zellzahl	34
4.2.9 DNA-Isolation aus den T1 Zelllinien	34
4.2.10 Transfektion der Zelllinie T1 mit den Expressionsvektoren	35
4.2.11 Blutabnahme von HLA-A2+/CMV-sero-positiven Spendern bzw. Psoriasis-Patienten und gesunden HLA-A2+ Kontroll-Probanden	35
4.2.12 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	36
4.2.13 Magnetische Zellsortierung von T-Zellen aus PBMC	36
4.2.14 Analyse des Proliferationsverhaltens von T-Zellen durch Anfärbung mit CFSE	37
4.2.15 Stimulation der T-Zellen durch die transfizierten T1 Zelllinien	37
4.2.16 Färbung von Zelloberflächenmolekülen	38
4.2.17 Durchflusszytometrie	38
4.2.17.1 Durchflusszytometrische Analyse der transfizierten T1 Zelllinien	38
4.2.17.2 Sortieren der T1 Zelllinien mittels Durchflusszytometrie	39
4.2.17.3 Analyse der PBMC und der durch magnetische Zellsortierung erhaltenen T-Zellen	39
4.2.17.4 Analyse der Aktivierung von CD8+ T-Zellen	39
4.2.18 Statistische Auswertung	39

5	Ergebnisse.....	40
5.1	Klonierung der Expressionsvektoren	40
5.1.1	Klonierung der Reporter eGFP und mCherry	41
5.1.1.1	Amplifikation der Nukleotidsequenzen von eGFP und mCherry	41
5.1.1.2	Restriktionsverdau der Expressionsvektoren zur Klonierung von eGFP und mCherry	42
5.1.1.3	Ligation und Identifikation der Klone pPB-MCS-eGFP und pPB-eGFP-mCherry	43
5.1.2	Klonierung von pp65, KRT17 und KRT13 in pPB-MCS-eGFP	46
5.1.2.1	Amplifikation der Nukleotidsequenzen von pp65, KRT17 und KRT13	46
5.1.2.2	Restriktionsverdau von pPB-MCS-eGFP zur Klonierung von pp65, KRT17 und KRT13	47
5.1.2.3	Ligation und Identifikation der Klone pPB-pp65-eGFP, pPB-KRT17-eGFP und pPB-KRT13-eGFP	48
5.2	Etablierung der Zelllinien	51
5.2.1	Die Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) im Lichtmikroskop und Durchflusszytometer ...	51
5.2.2	Transfektion der T1 Zelllinien und Transfektionseffizienz	52
5.2.3	Sortierung der transfizierten T1 Zelllinien	55
5.2.4	Nachweis der Antigene und Reporter im Genom der etablierten T1 Zelllinien ...	56
5.2.4.1	Nachweis von eGFP im Genom der T1 Zelllinien	56
5.2.4.2	Nachweis von pp65, KRT17 bzw. KRT13 im Genom der T1 Zelllinien	57
5.2.5	Oberflächenmoleküle der etablierten T1 Zelllinien	59
5.3	Stimulation von Spender-T-Zellen durch die etablierten T1 Zelllinien	59
5.3.1	Isolation von PBMC aus dem Vollblut und Ergebnisse der magnetischen Zellsortierung von T-Zellen	59
5.3.2	Ergebnisse der Stimulation von CD8+ T-Zellen HLA-A2+/CMV-sero-positiver Spender durch die Zelllinie T1-pp65-eGFP	60
5.3.3	Eingeschlossene Psoriasis-Patienten und ermittelte PASI-Scores	65
5.3.4	Ergebnisse der Stimulation von CD8+ T-Zellen HLA-A2+ Psoriasis-Patienten und HLA-A2+ gesunder Kontroll-Probanden durch die Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP	66
6	Diskussion	74
6.1	Begründung zur Auswahl der verwendeten APC-Zelllinie T1	75
6.2	Diskussion der Ergebnisse	76

6.2.1 Die untersuchten Oberflächenmarker von T1 erfüllen die Anforderungen an eine professionell antigenpräsentierende Zelllinie	76
6.2.2 Beide Promotoren des verwendeten Expressionsvektorsystems sind in den transfizierten T1 Zelllinien aktiv	77
6.2.3 T1 und die etablierten T1 Zelllinien lösen eine Alloreaktivität bei T-Zellen aus ..	78
6.2.4 Die antigenspezifische CD8+ T-Zell-Aktivierung von HLA-A2+/CMV-seropositiven Spendern hebt sich von der Alloreaktivität auf die T1 Zelllinien ab	79
6.2.5 Die Ergebnisse der Stimulationsexperimente mit T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP geben einen Anhalt darauf, dass es sich bei KRT17 und KRT13 um potentielle Autoantigene von CD8+ T-Zellen in der Psoriasis handelt	82
6.3 Limitationen und methodische Einschränkungen dieser Arbeit	86
6.3.1 Grenzen der ausgewählten APC-Zelllinie	87
6.3.2 Grenzen der Transfektionsmethode und des verwendeten Expressionsvektorsystems	88
6.3.3 Grenzen der durchgeführten Stimulationsexperimente	89
6.3.4 Offene Fragen und weitere Anregungen	91
6.4 Ausblick und Anregungen für die Forschung	92
6.4.1 Validierung der Ergebnisse an einer größeren Patienten-Kohorte	92
6.4.2 Untersuchung weiterer potentieller Autoantigene in der Psoriasis durch stabil-transfizierte T1 Zelllinien	92
6.4.3 Klinische Anwendungsmöglichkeiten	93
6.4.4 Anwendung bei anderen Autoimmunerkrankungen	94
7 Literaturverzeichnis	95
8 Eidesstattliche Versicherung	
9 Lebenslauf	
10 Danksagung	

1 Zusammenfassung

1.1 Abstrakt (Deutsch)

Die Psoriasis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Haut, Nägel und Gelenke, deren genaue Pathogenese noch unverstanden ist. In der letzten Zeit wird in der Psoriasis vulgaris insbesondere den CD8⁺ T-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Erkennung von Autoantigenen wie z.B. Zytokeratinen (KRT17) zugeschrieben. Allerdings gibt es bisher keine valide Methode, um eine antigenspezifische Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen von Psoriasis-Patienten durch bereits identifizierte und kontrovers diskutierte potentielle Autoantigene (z.B. KRT13) einheitlich zu testen, miteinander zu vergleichen und näher zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit hatte das übergeordnete Ziel, ein auf einer humanen antigenpräsentierenden (APC-) Zelllinie basierendes experimentelles in-vitro Testsystem für potentielle Autoantigene von CD8⁺ T-Zellen in der Psoriasis vulgaris zu entwickeln.

Dazu wurden jeweils zwei potentielle Autoantigene der Psoriasis (KRT17 und KRT13) und ein Kontroll-Antigen (Cytomegalievirus-CMV-Antigen pp65) in das piggyBacTm-Transposon Expressionsvektorsystem kloniert und durch Elektroporation in die humane HLA-A2⁺ APC Zelllinie T1 transfiziert. Zur Kontrolle der Expression wurde der piggyBacTm-Expressionsvektor pPB-eGFP-mCherry etabliert und ebenfalls in die Zelllinie T1 transfiziert. Nach vier durchflusszytometrischen Sortierungsschritten über die Reporter eGFP bzw. mCherry konnten die stabil-transfizierten T1 Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP, T1-KRT13-eGFP und T1-eGFP-mCherry etabliert werden.

In den Etablierungsexperimenten reagierten die T-Zellen von sechs getesteten HLA-A2⁺/CMV-sero-positiven Probanden neben einer generalisierten Aktivierung insbesondere mit einer signifikant höheren Expression von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ (hoch positiv) T-Zellen nach Stimulation mit T1-pp65-eGFP verglichen zur Stimulation mit den Referenzzelllinien T1-MCS-eGFP bzw. T1. Auf dieser Grundlage wurde die CD8⁺ T-Zell-Reaktion von acht HLA-A2⁺ Psoriasis-Patienten und sechs HLA-A2⁺ gesunden Kontroll-Probanden auf die Zelllinien T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP untersucht. Während bei nur einem gesunden Probanden die CD8⁺ T-Zellen mit einer deutlich höheren Expression von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ T-Zellen auf T1-KRT13-eGFP im Vergleich zu T1-MCS-eGFP reagierten, zeigten die CD8⁺ T-Zellen der Psoriasis-Patienten individuell unterschiedlich hohe Expressionen von CD8⁺ CD125⁺ CD137⁺ T-Zellen auf T1-KRT17-eGFP und/oder T1-KRT13-eGFP. In Relation zur ausgelösten

Aktivierung durch T1-MCS-eGFP wurden die CD8⁺ T-Zellen der Psoriasis-Patienten tendenziell stärker durch T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP aktiviert als die der gesunden Kontroll-Probanden.

In dieser Arbeit konnte neben alloreaktiven T-Zellen insbesondere durch die Messung der Expression von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ (hoch positiv) T-Zellen die Häufigkeit derjenigen CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden, die antigenspezifisch auf eine mit einem Antigen bzw. Autoantigen stabil-transfizierte T1 Zelllinie reagierten. Weiterhin konnte bei einigen Psoriasis-Patienten eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch KRT17 bzw. KRT13 aufgezeigt werden. Schlussendlich bietet das etablierte Testsystem neben der Untersuchung von anderen potentiellen Autoantigenen zugleich eine Grundlage, um weitere Analysen an den antigenspezifisch aktivierten CD8⁺ T-Zellen vorzunehmen.

1.2 Abstrakt (Englisch)

Psoriasis is a common chronic inflammatory skin disease, that can also affect the nails and joints. Although the pathogenesis of psoriasis vulgaris remains not fully understood, several studies recently suggested a critical role for CD8⁺ T cells reacting with autoantigens e.g. keratins (KRT17). However, there is a valid method missing in order to investigate an antigen-specific activation of CD8⁺ T cells through controversially discussed potential autoantigens (i.e. KRT13). The main aim of this study was to establish an in vitro test system for potential autoantigens of CD8⁺ T cells in psoriasis vulgaris, which is based on a human antigen presenting cell line (APC).

Therefore, two potential autoantigens (KRT17, KRT13) and a control antigen (Cytomegalovirus-CMV-antigen pp65) were cloned into the piggyBacTm-Transposon expression vector system and transfected into the HLA-A2⁺ human APC T1 by using electroporation. The piggyBacTm-expression vector pPB-eGFP-mCherry was created for expression control and also transfected into T1. After four cell sorting steps by flow cytometry on the basis of the reporters eGFP/mCherry, the stably transfected T1 cell lines T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP, T1-KRT13-eGFP and T1-eGFP-mCherry could be established.

Despite of a general activation induced by the T1 cell lines, the T cells of 6 HLA-A2⁺ CMV-sero-positive donors showed significantly higher frequencies of CD8⁺ CD25⁺ CD137^{high}⁺ cells in reaction to T1-pp65-eGFP compared to the reference cell lines T1-MCS-eGFP or T1. Due to

these results, the activation of CD8⁺ T cells from 8 HLA-A2⁺ psoriasis patients and 6 HLA-A2⁺ healthy controls through T1-KRT17-eGFP and T1-KRT13-eGFP were examined. In contrast to one healthy control donor, whose T cells obviously responded with a higher expression of CD8⁺ CD25⁺ CD137^{high}⁺ cells to T1-KRT13-eGFP, the CD8⁺ T cells of psoriasis patients showed variable frequencies of CD8⁺ CD25⁺ CD137^{high}⁺ cells to T1-KRT17-eGFP or T1-KRT13-eGFP compared to T1-MCS-eGFP. There is a trend, that the CD8⁺ T cells of the psoriasis patients became higher activated through T1-KRT17-eGFP and T1-KRT13-eGFP in relation to T1-MCS-eGFP than the CD8⁺ T cells of healthy controls.

This study could demonstrate beside alloreactive T cells an antigen-specific response of CD8⁺ T cells to with (auto)antigens stably transfected T1 cell lines by analysing the expression of CD8⁺ CD25⁺ CD137^{high}⁺ T cells. Furthermore the potential of KRT17 to activate CD8⁺ T-cells of psoriasis patients could be confirmed and even demonstrated for KRT13. Finally, the established test system provides beside the investigation of other potential autoantigens attractive options to make further analysis on antigen-specific activated CD8⁺ T cells.

2 Einleitung

2.1 Autoimmunerkrankungen: Wenn der Körper sich selbst angreift

Unter Autoimmunerkrankungen versteht man in der Medizin Erkrankungen, bei denen das Immunsystem körpereigene Strukturen irrtümlicherweise als zu bekämpfende Fremdkörper erkennt und durch Immunreaktionen angreift¹. Entzündliche Reaktionen bis hin zu schweren Organschäden können dadurch hervorgerufen werden. Aus dem breiten Spektrum von einem spezifisch betroffenen Organ bis hin zu verschiedenen Geweben im ganzen Körper kann abgeleitet werden, dass theoretisch jedes Organ und Gewebe Ziel einer Autoimmunerkrankung sein kann.

Die genaue Ursache der Entstehung eines Großteils der vielen verschiedenen Autoimmunerkrankungen ist noch nicht vollständig geklärt. Daher existiert bis heute für die meisten von ihnen auch keine kausale Therapie, und es kann häufig nur symptomatisch z.B. mit entzündungshemmenden oder modulierend mit immunsupprimierenden Medikamenten behandelt werden. Diese Tatsache ist ernüchternd und stellt deshalb Mediziner und Forscher in der Immunologie täglich vor die Herausforderung, die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen weiter zu ergründen und alternative Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Folglich ist aus Beobachtungen, klinischen Studien und Laborexperimenten im Laufe der Zeit eine Vielfalt von anerkannten Hypothesen zur Pathogenese einzelner Autoimmunerkrankungen entstanden. Ihnen ist gemeinsam, dass sie die Grundlage der Entstehung einer Autoimmunerkrankung in einer angeborenen genetischen Empfänglichkeit in Kombination mit bestimmten Umwelteinflüssen sehen. Bestimmte Umstände führen demnach dazu, dass Abwehrzellen körpereigene Strukturen (Autoantigene) als fremd erkennen, dadurch aktiviert werden und u.a. durch die Bildung von antigenerkennenden Strukturen (Autoantikörper) oder autoreaktiven Zellen deren Zerstörung einleiten. Forschungsanstrengungen zielen nun darauf ab, die Mechanismen der Immunantwort durch die Entwicklung experimenteller Methoden detaillierter nachzuvollziehen und gegebenenfalls diese Antigene bzw. Autoantigene näher zu identifizieren. An diesem Punkt setzt die vorliegende experimentell-wissenschaftliche Arbeit am Beispiel der Hauterkrankung Psoriasis vulgaris an.

2.2 Die Komponenten und Funktionen des Immunsystems und deren Rolle bei Autoimmunerkrankungen

2.2.1 Überblick über den Aufbau und die Funktionsweise des Immunsystems

Das Immunsystem des menschlichen Körpers dient vorrangig der Erkennung und Abwehr von Mikroorganismen, Viren und Fremdstoffen und ist aus einem komplexen Netzwerk von Zelltypen, Organen und Molekülen aufgebaut^{2,3}. Neben der Unterscheidung zwischen zellulärer und humoraler (nicht-zellulärer) Immunabwehr unterteilt man das Immunsystem grundlegend in zwei Komponenten: die angeborene und die adaptive Immunabwehr. Zudem leisten u.a. körpereigene Barrieren, wie z.B. Epithelien, durch Botenstoffe (Zytokine) vermittelte Entzündungsreaktionen, das antimikrobielle Enzym Lysozym und Interferone einen erheblichen Beitrag für die Immunfunktion. Zur stammesgeschichtlich deutlich älteren angeborenen und somit nicht erregerspezifischen Immunabwehr zählt man zur Phagozytose fähige Zellen wie z.B. Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, aber auch die humorale Immunantwort durch u.a. das Komplementsystem. Makrophagen gehen letztendlich aus Monozyten hervor und können neben der Beseitigung von abgestorbenem Material auch Antigene präsentieren. Die adaptive Immunabwehr entwickelte sich entwicklungsgeschichtlich später aus der angeborenen Immunabwehr und ist wesentlich anpassungsfähiger gegenüber neuen bzw. veränderten Krankheitserregern. Die Zellen der adaptiven Immunabwehr sind in der Lage, spezielle Strukturen (Antigene) zu erkennen und daraufhin gezielt spezifische Abwehrmechanismen einzuleiten und antigenspezifische Moleküle (Antikörper) zu bilden. Neben Antigenpräsentierenden Zellen (APC) und dendritischen Zellen stellen T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen) die Kernelemente der adaptiven Immunabwehr da, deren gemeinsamer Ursprung das Knochenmark ist. Alle T-Zellen sind durch das Oberflächenprotein CD3 (CD, engl. cluster of differentiation) gekennzeichnet und werden in mehrere Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt. So exprimieren zytotoxische T-Zellen zusätzlich den Co-Rezeptor CD8 und töten nach Antigenerkennung gezielt infizierte Zellen⁴. Dies kann hauptsächlich auf zwei unterschiedliche Arten geschehen: Zum einen können zytotoxische CD8+ Zellen durch Ausschüttung von Granzym B oder Perforinen eine Lyse bewirken, zum anderen über die Induktion der Fas-Signal-Kaskade eine Apoptose der Zielzellen herbeiführen⁴. Daneben können aktivierte CD8+ T-Effektorzellen durch die Produktion von Zytokinen wie z.B. IFN- γ und TNF- α u.a. die virale Replikation hemmen, Makrophagen zu den Infektionsherden locken oder Tumorzellen eliminieren⁴. T-Helferzellen (CD4+) übernehmen

verschiedene andere Aufgaben und unterstützen u.a. CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen in ihrer Funktion^{4,5}. Anhand ihrer sezernierten Zytokine werden diese CD4⁺ T-Effektorzellen in Th1-Zellen (IFN- γ , IL-2 und TNF- γ) und Th2-Zellen (IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13) weiter eingeteilt⁴. Diese Unterteilung wurde erstmalig durch Mosmann et al. (1986) beschrieben⁶. Nach Stimulation mit einem bestimmten Antigen werden vermehrt spezifische T-Zellen gebildet, darunter auch sogenannte T-Gedächtniszellen mit einer „Erinnerungsfunktion“. So werden T-Gedächtniszellen bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen sofort aktiviert und ermöglichen auf diese Weise eine effizientere Immunantwort⁴. In der letzten Zeit wurden einige neue Populationen von T-Zellen entdeckt. Dazu zählt u.a. auch eine Population von CD4⁺ T-Effektorzellen, die nach dem von ihnen sezernierten Zytokin IL-17 entsprechend Th17-Zellen genannt werden. Die Anwesenheit und einige Funktionen von Th17-Zellen wurden bereits in einigen Modellen von entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen beschrieben⁷. Eine weitere Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}), die T-Zell-Antworten unterdrücken und folglich Immunantworten begrenzen können⁸.

B-Zellen bilden Antikörper gegen Erreger. Ähnlich wie bei den T-Zellen können sich nach einer überstandenen Infektion auch aus B-Zellen sogenannte B-Gedächtniszellen entwickeln⁵. Aufgrund dieser unterschiedlichen Funktionen entsteht der Eindruck, das adaptive Immunsystem könne das angeborene ersetzen. Jedoch ist das Gegenteil der Fall: Beide Abwehrsysteme arbeiten miteinander zusammen und erst ihr komplexes Zusammenspiel ermöglicht eine koordinierte Immunabwehr des Körpers.

Bei der Erkennung und Reaktion auf Antigene gibt es grundlegende Unterschiede zwischen B-Zellen und T-Zellen. Im Vergleich zu den T-Zellen erkennen B-Zellen ihre Antigene (z.B. Pathogene oder Toxine) direkt in ungebundener Form durch spezielle Antikörper, die auch Immunglobuline (Ig) genannt werden. Immunglobuline sind Teil des humoralen Immunsystems und können in membrangebundener Form als B-Zell-Rezeptor (BCR) vorkommen, aber auch von ausdifferenzierten B-Zellen (Plasmazellen) sezerniert werden⁵.

Die Antigen-Erkennung durch T-Zellen erfolgt nach einem anderen Prinzip. Da sich die vorliegende experimentell-wissenschaftliche Arbeit zentral mit dieser Thematik auseinandersetzt, wird hier nun entsprechend genauer darauf eingegangen.

2.2.2 T-Zellen erkennen prozessierte Antigene über MHC-Komplexe

Im Gegensatz zu den B-Zellen erkennen die T-Zellen durch ihre T-Zell-Rezeptoren (TCR) fremde Antigene nicht im nativen Zustand, sondern nur, wenn ihnen diese in Fragmenten auf der Oberfläche von Körperzellen oder APC (engl. antigen-presenting cells) präsentiert werden. Genaugenommen kann nur ein zusammengesetzter Ligand, bestehend aus einem Peptid und einem körpereigenen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl. Major Histokompatibility Complex) mit dem TCR in Wechselwirkung treten⁹. Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Klassen von MHC-Molekülen. MHC-Moleküle der Klasse I (HLA-Klasse-I-Moleküle) sind charakteristisch für alle kernhaltigen Zellen des Körpers und können kurze, acht bis zehn Aminosäuren lange Peptide präsentieren. MHC-Proteine der Klasse II (HLA-Klasse-II-Moleküle) kommen dagegen nur auf der Oberfläche von APC (z.B. dendritische Zellen oder Makrophagen) vor und binden deutlich längere Peptide. Die präsentierten Peptide werden durch das Proteasom der Zelle aus kontinuierlich gebildeten Proteinen in großer Anzahl und Vielfalt aufbereitet (prozessiert) und stellen somit als Spaltprodukte (Fragmente) auf den MHC-Komplexen ein Abbild der in der Zelle produzierten Proteine dar. Heute weiß man, dass die Antigenerkennung durch T-Zellen vom Vorhandensein ganz spezifischer MHC-Moleküle auf den APC abhängig ist. Dieses Phänomen wird MHC-Restriktion bezeichnet und durch zwei Mechanismen gewährleistet⁹: Erstens sind MHC-Moleküle polygen, d.h. die MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Komplexe werden jeweils von einer Vielzahl von so genannten HLA (engl. Human Leukozyte Antigen)- Genen auf Chromosom 6 kodiert. Beispielsweise sind drei Gene für die Alpha-Kette der MHC-Klasse-I-Komplexe bekannt, die als HLA-A, -B und -C bezeichnet werden. Auch für die Alpha und Beta-Kette der Klasse II-Komplexe gibt es drei Paare von Genen, genannt HLA-DR, -DP und -DQ. Somit verfügt jedes Individuum über eine bestimmte Gruppe von MHC-Molekülen (Haplotypen) mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten. Zweitens ist der MHC-Komplex polymorph, d.h. auf Populationsebene existiert eine große Anzahl von verschiedenen Allelen, die zu unterschiedlichen Versionen und einer variablen Expression bei den Individuen führt. Der entscheidende Unterschied zwischen den allelischen MHC-Varianten besteht im peptid-bindenden Spalt. Folglich binden und präsentieren verschiedene MHC-Varianten jeweils unterschiedliche Antigene. Interessant ist, dass bei vielen Autoimmunerkrankungen, insbesondere z.B. Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises eine Assoziation zum Vorhandensein ganz bestimmter MHC-Allele beobachtet wurde. Das bereits seit mehreren Jahrzehnten wohl bekannteste Beispiel hierfür ist die Assoziation der Spondylitis ankylosans mit HLA-B27¹⁰. Doch welche Autoantigene über diese bestimmten

MHC-Komplexe spezifische Immunreaktionen auslösen, bleibt häufig nur unzureichend geklärt. Am Ende der vorliegenden experimentell-wissenschaftlichen Arbeit wird vor allem die Antigenerkennung über das HLA-A2 Allel erörtert.

Mithilfe der beschriebenen MHC-Restriktion lässt sich auch die Nicht-Selbst-MHC-Erkennung bei z.B. der Transplantatabstoßung erklären. Bei dieser Immunreaktion wird im engeren Sinne auch von einer Alloreaktivität gesprochen. Hierunter versteht man das Phänomen, wenn eine gewisse Anzahl von T-Zellen eines Individuums gegen Zellen der gleichen Spezies, die unterschiedliche Allele von MHC-Peptidkomplexen tragen, reagiert ¹¹.

Neben dem TCR sorgen auch die Co-Rezeptoren CD4 bzw. CD8 dafür, dass T-Zellen an einen Peptid-MHC-Komplex binden. So erkennen CD4+ T-Zellen über den MHC-Klasse-II-Komplex präsentierte fremde Peptide spezifisch. CD8+ T-Effektorzellen erkennen dagegen jede Zelle des Organismus, die ihnen über ein MHC-Klasse-I-Komplex Fragmente von intrazellulären Erregern (v.a. Viren) oder veränderte bzw. mutierte Peptide präsentiert ⁴.

2.2.3 Die Aktivierung von T-Zellen

T-Zellen benötigen im Grunde genommen zwei wegweisende Signale, um vollständig aktiviert zu werden: das erste Signal wird durch die antigenspezifische Bindung des TCR an den antigentragenden MHC-Komplex auf der Oberfläche der APC vermittelt. Das zweite co-stimulatorische Signal entsteht u.a. durch die Interaktion von CD28 der T-Zelle mit seinen Liganden CD80 und CD86 auf der APC. Beide Signale zusammen ermöglichen es naiven T-Zellen durch die Synthese von IL-2 zu proliferieren bzw. sich in bewaffnete Effektorzellen zu differenzieren ¹². Dafür ist das Vorhandensein der α -Kette (CD25) des IL-2-Rezeptors auf aktivierten T-Zellen entscheidend ¹³.

Zur Umwandlung von naiven CD8+ T-Zellen in zytotoxische Zellen sind bereits verschiedene co-stimulatorische Prozesse beschrieben. Beispielsweise können manche reife, virusinfizierte APC unter bestimmten Bedingungen selbst CD8+ T-Zellen zur Synthese von IL-2 stimulieren, was deren Proliferation und Differenzierung vorantreibt. In den meisten Fällen jedoch ist eine zusätzliche Unterstützung durch CD4+ T-Effektorzellen notwendig, deren Aktivierung möglicherweise auch eine unpassende Stimulation von naiven CD8+ T-Zellen durch virusinfizierte APC reguliert ⁴. Über die Bindung des CD40-Liganden auf der CD4+ T-Zelle an das CD40 auf der APC wird die APC dazu angehalten, CD80 und CD86 zu exprimieren und auf

diese Weise eine Co-stimulation der naiven CD8⁺ T-Zelle direkt über CD28 und CTLA-4 zu bewirken¹⁴.

2.2.4 CD137 (4-1BB) - ein Marker für antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen

T-Zellen reagieren nur dann einwandfrei auf präsentierte Antigene, wenn sie neben den Signalen des TCR zusätzlich durch co-stimulatorische Signale auf den APC aktiviert werden. So ist insbesondere für die initiale Aktivierung von naiven T-Zellen die Interaktion von CD28 mit seinen Liganden CD80 und CD86 auf den APC entscheidend. Zur Aufrechterhaltung und Modulation der Immunantwort werden im Anschluss an diese initiale Aktivierungsphase eine Vielzahl von weiteren co-stimulatorischen Rezeptor-Ligand-Paaren auf T-Zellen und APC hochreguliert. Hierzu zählt u.a. der Rezeptor CD137 (auch bekannt als 4-1BB) mit seinem Ligand CD137L (4-1BBL). CD137 ist ein Vertreter der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie und wird sowohl auf aktivierten CD4⁺¹⁵ als auch CD8⁺ T-Zellen¹⁶ exprimiert. Zudem konnte erst kürzlich durch die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Expression von CD137 auch zur Identifikation von spezifisch aktivierten humanen CD4⁺ Foxp3⁺ T_{reg}-Zellen in einem definierten Zeitfenster verwendet werden kann¹⁷. Die Expression von CD137 in vitro erreicht je nach T-Zell-Stimulus ihren Höhepunkt nach etwa 16 - 48 Stunden und bleibt noch bis zu 4 - 5 Tage hochreguliert^{16,18-20}. Sein Ligand, CD137L (4-1BBL) kommt auf aktivierten APC wie Makrophagen, B-Zellen und Dendritischen Zellen vor²¹⁻²³. CD137 fördert als ein co-stimulatorisches Molekül sogar unabhängig von CD28 die Proliferation bzw. das Überleben von aktivierten T-Zellen und verhindert deren aktivierungs-induzierten Zelltod durch anti-apoptotische Signale^{24,25}. Sowohl am Maus-Modell als auch bei humanen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit 4-1BBL etwa in gleichem Maße expandieren und Th1-Zytokine (z.B. IFN- γ) produzieren^{18,24}. Allerdings fördert CD137L bei humanen CD8⁺ T-Zellen im Unterschied zum Maus-Modell nicht nur allein deren Expansion, sondern unterstützt zugleich die Umwandlung von Gedächtniszellen in das ausdifferenzierte CD27⁻ Effektor-Stadium²⁶. Außerdem führt CD137L zu einer Hochregulierung der Expression von Effektor-Molekülen bei CD8⁺ T-Zellen, wie z.B. Perforin, Granzym A und Bcl-X_L²⁶.

Um die zelluläre Immunität unter gesunden und pathologischen Bedingungen genauer zu verstehen, ist es u.a. wichtig, die Rolle von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen. Jedoch setzt sich die in vivo CD8⁺ Immunantwort aus vielen unterschiedlichen Subpopulationen

mit sehr heterogenen Zytokin-Profilen zusammen und kann deshalb nicht durch ein einziges Zytokin erfasst werden ^{20,27,28}. Auf der Suche nach einem Oberflächenmolekül, das bei der CD8+ T-Zell-Reaktion auf ein bestimmtes Antigen einheitlich hochreguliert ist, charakterisierte Wolfl et al. (2007) CD137 als einen Surrogatmarker, um antigenspezifische CD8+ T-Zellen zu detektieren und für weitere Untersuchungen zu isolieren bzw. zu expandieren ²⁰. Folglich kann mittels 4-1BB die Gesamtheit antigenspezifischer CD8+ T-Zellen untersucht werden, ohne die genauen Details der Epitope zu kennen ²⁰.

2.2.5 Mechanismen der Selbsttoleranz und Hypothesen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen

Die Oberflächenstrukturen von Zellen des menschlichen Organismus unterliegen einer ständigen Überprüfung: Permanent interagieren T-Zellen mit MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche von APC oder Körperzellen um zu erkennen, ob diese körpereigene oder fremde Peptide (z.B. nach einer viralen Infektion) exprimieren und präsentieren. Im Normalfall erkennen T-Zellen körpereigene Strukturen nicht als fremd, denn in einer Art Schulungsprozess lernen naive T-Zellen während ihrer Reifung im Thymus körpereigene Strukturen zu tolerieren (zentrale Toleranz). Durch positive Selektion überleben nur diejenigen T-Zellen, die körpereigene MHC-Komplexe erkennen und binden. Zusätzlich werden durch negative Selektion diejenigen T-Zellen eliminiert, die körpereigene MHC-Komplexe zu fest binden und dadurch aktiviert werden.

Ferner besitzt der Körper einige periphere Toleranzmechanismen, um eine Reaktion gegen körpereigene Antigene zu verhindern. Durch das synergistische Zusammenwirken einzelner „Kontrollpunkte“ schützt sich der Körper vor der Entwicklung einer Autoimmunität, ohne dabei die Abwehr gegen Krankheitserreger zu stark zu beeinträchtigen. Hierzu zählen die Anergie (zelluläre Inaktivierung), Deletion (Apoptose) und die Unterdrückung der Immunantwort durch regulatorische T-Zellen. Ein gewisses Maß an Autoreaktivität ist allerdings physiologisch um ein Repertoire an reifen Lymphozyten zu erhalten und das Überleben von naiven Lymphozyten zu sichern ²⁹.

Eine Autoimmunerkrankung entsteht offenbar dann, wenn einige der genannten Mechanismen der Selbsttoleranz versagen bzw. überwunden werden und sich dadurch eine nachhaltige Reaktion auf Autoantigene entwickelt. Da dieser Prozess sehr häufig eine genetische Grundlage hat und demzufolge spontan entsteht, sind auslösende Faktoren und potentielle Autoantigene

schwer zu erkennen. Zwar konnten bei vielen Autoimmunerkrankungen, z.B. der Myasthenia gravis, bereits wichtige Autoantikörper und Antigene identifiziert werden ³⁰, jedoch bleibt für einige andere die Immunpathogenese noch offen. Weiterhin wurde herausgefunden, dass neben z.B. starkem Stress, der Einnahme bestimmter Medikamente oder einer Schwangerschaft vor allem Infektionen eine Autoimmunerkrankung verschlechtern oder sogar auslösen können. Hierbei wird diskutiert, dass die Krankheitserreger Epitope exprimieren, die z.B. körpereigenen Nukleotidsequenzen sehr ähnlich sind und so zu einer Sensibilisierung von Immunzellen gegen körpereigenes Gewebe führen. Dieses Prinzip der Kreuz-Reaktivität wird als molekulare Mimikry bezeichnet und im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher darauf eingegangen.

Betrachtet man einzelne Mechanismen dieser Erkrankungen genauer, so ist in der Tat eine starke Ähnlichkeit zur Immunantwort auf Krankheitserreger zu erkennen: Bei bestimmten Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) entstehen die Schädigungen vor allem durch Autoantikörper, die entsprechende Komplement- und Fc-Rezeptor-System-vermittelte Reaktionen auslösen ³⁰. Damit die B-Zelle pathogene Antikörper produzieren kann, ist aber auch immer die Interaktion des TCR einer CD4+ T-Zelle mit dem MHC-Klasse-II-Molekül der B-Zelle erforderlich ⁵. Auf der anderen Seite zerstören autoreaktive zytotoxische T-Zellen z.B. die Betazellen des Pankreas bei Diabetes Typ I, als seien sie mit Viren infiziert ³¹. Eine Autoimmunerkrankung wird demnach nicht nur durch einen einzigen Effektorweg hervorgerufen, sondern das gesamte Immunsystem mit seinen T-Zellen, B-Zellen und u.a. dendritischen Zellen kann involviert sein. Nichtsdestotrotz wird für einzelne organspezifische Autoimmunerkrankungen vermutet, dass eine bestimmte Art von Reaktion bei der Erzeugung von Schäden vorherrschend ist. An dieser Stelle setzt sich die vorliegende Arbeit mit der Hauterkrankung Psoriasis vulgaris auseinander. Die aktuelle Evidenzlage liefert zahlreiche Hinweise darauf, dass bei der Psoriasis vor allem bestimmte T-Zell-Populationen eine Rolle spielen. Durch die Anwendung verschiedener Methoden ist in der letzten Zeit die Anzahl verdächtiger Autoantigen-Kandidaten gestiegen, wobei bisher nur bei einigen die Aktivierung von T-Zellen nachgewiesen werden konnte. Diese Tatsache macht die Psoriasis vulgaris zu einem sehr interessanten Forschungsthema in der Immunologie.

2.3 Psoriasis vulgaris – eine durch T-Zellen vermittelte Hauterkrankung mit genetischer Disposition

2.3.1 Klinisches Erscheinungsbild und Verbreitung der Psoriasis vulgaris

Die Psoriasis ist auch unter dem Namen Schuppenflechte bekannt. Dabei handelt es sich um eine chronische, in der Regel schubweise verlaufende entzündliche Erkrankung, die Haut, Nägel und in bis zu 30% auch Gelenke betrifft³². 2-4% der Weltbevölkerung leiden an dieser Krankheit, wobei Europäer häufiger als Asiaten und Afrikaner betroffen sind^{33,34}. Das klinische Bild ihrer häufigsten Erscheinungsform, der Psoriasis vulgaris, zeichnet sich durch zumeist juckende scharf begrenzte erythematöse Plaques mit aufsitzenden, nicht fest haftenden silbrig-weißen groben Schuppen aus. Prädilektionsstellen der Effloreszenzen sind die Streckseiten der Extremitäten, die behaarte Kopfhaut, die Sakralregion und die Rima ani. Weiterhin treten im Laufe der Erkrankung bei bis zu der Hälfte der Patienten Nagelveränderungen in Form von so genannten Tüpfelnägeln, „Ölflecken“ unterhalb der Nagelplatte und Krümelnägeln auf³⁵.



Psoriasis-Plaques am Knie, Foto F.Buttgereit



Nagelveränderungen bei Psoriasis, Foto F.Buttgereit

Die klinische Manifestation der Erkrankung kann individuell sehr unterschiedlich sein. In akuten Schüben können die Psoriasis-Herde von einer Punktgröße (Psoriasis punctata) auf Tropfengröße (Psoriasis guttata) bis Münzgröße (Psoriasis nummularis) zunehmen. Das chronische Stadium mit großen polyzyklisch begrenzten Plaques wird als Psoriasis geographica bezeichnet. Dreht sich in einem Sonderfall das typische klinische Erscheinungsbild der Psoriasis vulgaris um,

indem vor allem die intertriginösen Areale der Haut befallen sind (Axillen, Inguinalregion, Submammäre Region), spricht man von einer Psoriasis inversa. Bei der Psoriasis arthropathica sind neben der Haut zusätzlich einige Gelenke von Hand und Fuß, häufig in Form einer asymmetrischen Polyarthritits mit strahlartigem Befallsmuster, betroffen ³⁶.

2.3.2 Genetische Aspekte der Psoriasis

Der genetische Hintergrund der Erkrankung wird aus klinischen Studien an erkrankten Familien und Zwillingen ersichtlich: Ist ein Elternteil erkrankt, so liegt das Risiko für das Kind auch an Psoriasis zu erkranken bei 8,1%, bei zwei erkrankten Eltern sogar bei 41% ³⁵. Das Konkordanzrisiko bei eineiigen Zwillingen ist sogar um das Zwei- bis Dreifache höher als bei zweieiigen Zwillingen ^{35,37}. Heute wird die Psoriasis als eine erbliche Dispositionskrankheit verstanden, die einer multifaktoriellen Vererbung und bestimmten Umwelteinflüssen unterliegt. Dazu konnten bisher neun mit Psoriasis assoziierte Suszeptibilitätsgene identifiziert werden: PSORS (PSORiasis susceptibilty gene) 1-9. Das im MHC-I Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 sich befindende PSORS 1 Gen stellt dabei das wichtigste HLA-Gen dar, denn es kodiert u.a. für den mit Psoriasis assoziierten HLA-Typ Cw6 ^{38,39}. Das HLA-Cw6-Allel wurde neben weiteren Allelen wie u.a. HLA-DR7, HLA-B57 und HLA-B17 häufig bei der Psoriasis Typ I gefunden, die mit einer erhöhten familiären Belastung, einer frühen Manifestation (im 20. - 30. Lebensjahr) und klinisch schweren Verläufen einhergeht. Hingegen zeigt die sich erst später manifestierende (im 50. - 60. Lebensjahr) und klinisch leichter verlaufende Psoriasis vom Typ II keine familiäre Häufung und eine geringere Korrelation zu den genannten HLA-Typen ³⁵. Im Laufe der letzten Jahre wurden immer wieder neue Assoziationen der Erkrankung zu weiteren HLA-Allelen ergründet, u.a. auch zu dem MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A2 ^{40,41}.

Doch wie lässt sich die starke Verbreitung der genetischen Prädisposition für Psoriasis erklären? Im Schuppenmaterial des Stratum corneum wurden mit den β -Defensinen antibakterielle Proteine gefunden, die den Menschen vor Hautinfektionen schützen ⁴². Da Psoriatiker durch die Hyperproliferation der Epidermis offensichtlich große Mengen davon besitzen und sie zudem signifikant weniger an bakteriellen Hautinfektionen leiden, wird der Veranlagung zur Psoriasis ein Selektionsvorteil in der Evolutionstheorie zugesprochen, der ihre Verbreitung förderte ⁴³.

2.3.3 Provokationsfaktoren

Der chronisch-rezidivierende Verlauf und die stigmatisierenden Hauterscheinungen der Psoriasis vulgaris stellen für Betroffene eine starke Belastung auf psychischer, sozialer und beruflicher Ebene dar. Zwar ermöglichen derzeitige Therapien eine Verbesserung des Hautzustandes und führen sogar teilweise zu einer Abheilung der Hautveränderungen, jedoch können sie nicht das rezidivierende Auftreten von Schüben verhindern.

Obwohl die genaue Pathogenese der Psoriasis bis heute noch nicht ganz verstanden ist, konnten in den letzten Jahrzehnten zusätzlich einzelne Provokationsfaktoren erkannt werden: So kann, neben der beschriebenen genetischen Prädisposition, die Einnahme von bestimmten Medikamenten wie Betablockern, Lithium, Interferonen und Chloroquin die Entwicklung einer Psoriasis induzieren bzw. eine bestehende Erkrankung verschlechtern ⁴⁴. Die Beobachtung, dass psychotherapeutische Betreuung während einer Psoriasis Therapie den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst, lassen auch einen Zusammenhang mit psychischen Faktoren wie Stress und Depression vermuten ⁴⁵. Als entscheidender Triggerfaktor für den Ausbruch und der Verschlechterung einer Psoriasis wird allerdings eine Infektion mit beta-hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe A gesehen und stellt somit die am meisten anerkannte Hypothese zur Immunpathogenese dar. ⁴⁶.

2.4 Die Immunpathogenese der Psoriasis vulgaris

In dem histologischen Präparat einer Psoriasis-Plaue fällt neben Ansammlungen von Leukozyten in Dermis und Epidermis auch eine massive Verbreiterung der Epidermis (Akanthose) auf. Die Vermutung liegt nahe, dass die bis auf das 8-fache beschleunigte Proliferation der Keratinozyten immunvermittelt ist. Dabei proliferieren die Keratinozyten so schnell, dass sie es nicht mehr schaffen, auszureifen und somit selbst im Stratum corneum noch ihre Kerne besitzen (Parakeratose). Zudem sind die Blutgefäße dilatiert, was für eine Entzündung spricht und die rote Farbe der Hauterscheinungen erklärt ³⁵.

Während für lange Zeit allgemein die Ansicht vertreten wurde, dass die Entstehung der Psoriasis vor allem auf der offensichtlichen Störung von Proliferation und Differenzierung epidermaler Keratinozyten beruhe ^{47,48}, stellten wichtige Beobachtungen über die Rolle von T-Lymphozyten zunehmend die immunologischen Vorgänge in den Vordergrund. Mit der Anwendung einer immunsuppressiven Therapie lieferten Mueller et al. (1979) den ersten Hinweis darauf, dass es

sich bei der Psoriasis um eine durch T-Zellen vermittelte Hauterkrankung handelt. So führte die systemische Behandlung mit Cyclosporin A, das die Aktivierung von T-Zellen durch die Bindung an intrazelluläres Calcineurin hemmt, zu einer Besserung der Beschwerden ⁴⁹. In darauffolgenden Versuchen konnte u.a. gezeigt werden, dass das neue Auftreten von Psoriasis-Herden mit einer erhöhten Anzahl von HLA-DR+ dendritischen Zellen und der epidermalen Infiltration von T-Zellen einhergeht ⁵⁰. Seitdem wird u.a. den T-Zellen und ihrer Interaktion mit APC bzw. Keratinozyten eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Psoriasis zugesprochen ⁵¹. Inzwischen kann man aus histologischen Schnitten und Färbemethoden von Psoriasis-Herden entnehmen, dass den Großteil der in die Dermis infiltrierenden T-Lymphozyten CD4+ T-Zellen stellen, während in der Epidermis vor allem die alpha-1-beta-1 Integrin positiven CD8+ T-Lymphozyten vorherrschen ⁵². Aktuellen Studienergebnissen zufolge zeigen die CD4+ und CD8+ T-Zellen in der Epidermis von Psoriasis-Plaques sogar höhere Expressionen von den mit einer Aktivierung einhergehenden Genen (IL-17A, IL-22 und IFN- γ) als in der Dermis ⁵³. Allerdings scheint die noch bis vor kurzem allgemein vertretende Ansicht überholt, wonach die Psoriasis eine vorrangig durch Th1-Lymphozyten vermittelte Hautkrankheit sei. Neuerdings wird u.a. ein pathologisches Wechselspiel von u.a. Th1-, Th17- und T_{reg}- Zellen für die Krankheitsentstehung verantwortlich gemacht ⁵⁴. Aufgrund der Komplexität der Thematik und im Hinblick auf die Zielstellung konzentriert sich diese Arbeit neben den CD4+ T-Zellen insbesondere auf die Rolle von CD8+ T-Zellen in der Psoriasis.

2.4.1 Die Rolle von CD4+ und CD8+ T-Zellen bei der Erkennung potentieller Autoantigene in der Psoriasis vulgaris

In vielen Studien der letzten Jahrzehnte wurde bereits über den Zusammenhang zwischen einem Ausbruch oder einer Exazerbation der Erkrankung mit einer Infektion der oberen Atemwege mit beta-hämolysierenden Streptokokken der Gruppe A berichtet ^{55,56}. Folglich entwickelte sich schnell die Vorstellung, dass bestimmte Antigene der Streptokokken verantwortlich für die Aktivierung von T-Zellen sein müssten. Zudem bestärkten mehrere Berichte unabhängiger Arbeitsgruppen über oligoklonale Expansionen von T-Zellen oder den eingeschränkten Gebrauch gewisser V β -TCR in den Hautläsionen eine Beteiligung von antigenspezifischen T-Zellen ^{57,58}.

Heutzutage wird als entscheidende Ursache der Psoriasis eine angeborene immunologische Fehlfunktion angesehen, die u.a. auf der Ähnlichkeit von M-Proteinen der Streptokokken und

einigen humanen Zytokeratinen der Epidermis beruht. Zytokeratine bilden als Tonofilamente einen wesentlichen Bestandteil des Stratum corneum und bestehen aus Gruppen eng verwandter Polypeptide, die in bestimmter Reihenfolge im Laufe der Differenzierung der Keratinozyten kombiniert werden. Das M-Protein der Streptokokken ist aus sogenannten fibrillären, alpha-helicalen Coiled Coil-Dimeren aufgebaut, die an der Oberfläche der Bakterien hervorragen⁵⁹. Es wurde herausgefunden, dass so genannte Typ I-Keratine (z.B. Keratin 17) in ihrer Aminosäuresequenz mit dem M6 Protein der Streptokokken die größten Ähnlichkeiten aufzeigen⁶⁰. Bei entsprechender genetischer Veranlagung scheint das Immunsystem nach einer Streptokokkeninfektion irrtümlicherweise durch Keratine im Sinne einer molekularen Mimikry stimuliert zu werden^{46,61}. In der Tat zeigten Sigmundsdottir et al. (1997) und Gudmundsdottir et al. (1999), dass periphere T-Zellen von an Psoriasis erkrankten Patienten, aber nicht von gesunden Kontrollen auf verschiedene, mit dem M-Protein korrespondierende synthetische Peptide u.a. durch die Produktion von IFN- γ reagieren^{62,63}. Hierbei wurden im Vergleich zu den anderen Peptiden die häufigsten und stärksten Antworten auf das Peptid 146K-17 von Keratin 17 beobachtet, das die ALEEAN-Sequenz mit dem M6-Protein teilt. Die Antwort auf das 146K-17 Peptid von Keratin 17 fiel sogar stärker aus als auf das korrespondierende 146-M Peptid der Streptokokken. Beide Peptide unterscheiden sich bezüglich der die ALEEAN-Sequenz flankierenden Aminosäuren⁶³. Interessanterweise waren in beiden Studien nach erfolgreicher Behandlung keine T-Zell-Antworten auf die M- und Keratin-Peptide mehr nachweisbar, während die Reaktion auf die Kontroll-Antigene Streptokinase/Streptodornase unbeeinflusst blieb.

Im Gegensatz zu den geschilderten Forschungsergebnissen sieht eine andere Arbeitsgruppe das M-Protein nicht als hauptursächlich für das molekulare Mimikry an: So proliferierten nach Baker BS et al. (2001) aus Psoriasis-Plaques gewonnene Th1-Zelllinien deutlich schwächer auf rekombinantes M-Protein im Vergleich zu anderen Antigenen der Zellmembran und Zellwand von Streptokokken⁶⁴. Später entdeckte dieselbe Arbeitsgruppe, dass mindestens die Hälfte der für die Streptokokken-Zellwand-spezifischen Th1-Zellen aus Psoriasis-Plaques spezifisch auf Peptidoglykan reagierten⁶⁵. Peptidoglykan, der Hauptbestandteil der Zellwand gram-positiver Streptokokken, ist durch seine Interaktion mit dendritischen Zellen und Monozyten als ein starker proinflammatorischer Stimulus bekannt^{66,67}. Im Detail wurde beobachtet, dass in der Dermis von betroffener Haut vermehrt Peptidoglycan-enthaltende Makrophagen vorkamen, die von dermalen CD4+ T-Lymphozyten umgeben waren⁶⁵. Demnach schlussfolgerte diese Arbeitsgruppe, dass eine veränderte angeborene Immunantwort auf Peptidoglykan zu einer erhöhten pathologischen Aktivierung und Expansion von T-Lymphozyten in Psoriasis-Läsionen beitragen kann⁶⁸.

Jedoch berücksichtigen diese Ergebnisse nicht die in anderen Studien beschriebene kritische Rolle von epidermalen CD8+ T-Lymphozyten bei der Krankheitsentstehung⁵². So untermalte Johnston et al. (2004) die Bedeutung der CD8+ T-Zellen bei HLA-Cw6 positiven Psoriasis-Patienten, indem diese mit peptid-spezifischen Antworten auf die von Keratin 17 und dem M6-Protein abstammenden Peptide durch die Sekretion von IFN- γ reagierten. Die Antworten von CD4+ T-Zellen waren hingegen vergleichsweise schwach ausgeprägt⁶⁹. Hervorzuheben ist, dass an dieser Reaktion hauptsächlich die auf die Haut beschränkte CLA (engl. Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen) exprimierende Subpopulation der CD8+ T-Zellen beteiligt war, deren Häufigkeit im Blut anscheinend mit der Krankheitsaktivität korreliert^{69,70}. Sie schlussfolgerten, dass Psoriasis-Patienten CLA+ CD8+ T-Zellen aufweisen, die mit der Produktion von IFN- γ auf Keratin-Peptide reagieren.

Aus diesen gesammelten Erkenntnissen entwickelte Valdimarsson et al. (2009)⁶¹ eine Modellvorstellung zur Erklärung der potentiellen Rolle von CD4+ und CD8+ T-Zellen in der Psoriasis und wie mögliche Streptokokken-Antigene die Erkrankung triggern bzw. aufrechterhalten: Demnach würden die vorrangig in der Dermis vorkommenden CD4+ T-Zellen vor allem Komponenten von Streptokokken, wie Peptidoglykane erkennen. Autoreaktive CLA exprimierende CD8+ T-Zellen hingegen würden in die Epidermis einwandern und dort auf zum M-Protein homologe Keratin-Peptide reagieren, die ihnen von epidermalen APC präsentiert werden. Laut den aktuellsten Studienergebnissen sind CD8+ T-Zellen in der Epidermis von Psoriasis-Läsionen sogar stärker aktiviert als CD4+ T-Zellen und produzieren größere Mengen von IFN- γ und IL-17A^{53,71}. Bei diesen Experimenten entdeckte Cheuk et al. (2014), dass selbst epidermale T-Zellen in geheilten Hautstellen noch IL-17 und IL-22 produzieren. Dies würde zu dem neu entworfenen Modellvorstellung von krankheitsmodulierenden T (T_{RM})- Zellen (T_{RM}, engl. Tissue-Resident Memory) in der Psoriasis passen⁵³.

Auf der Suche nach weiteren Psoriasis-Autoantigenen lieferten Jones et al. (2004)⁷² mit der Erstellung von cDNA-Expressionsbibliotheken aus Psoriasis-Plaques bzw. Keratinozyten einen interessanten Ansatz: Mit Hilfe des in der Tumorummunologie verwendeten Verfahrens SEREX (engl. Serological identification of antigens by recombinant expression cloning) wurde die Anzahl der möglichen Autoantigene auf 11 Kandidaten-Antigene eingegrenzt und anschließend die Proteine mit den jeweiligen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell) der entsprechenden Psoriatiker in Reaktion gebracht. Als Ergebnis induzierten die drei Proteine Keratin 13, hnRMP-A1 und FLJ00294 die höchste Produktion von IFN- γ , die mittels ELISPOT (engl. Enzyme Linked Immuno Spot Assay) visualisiert wurde⁷². Die gleiche Technik, aber mit einem abgewandelten Denkansatz wählte die

Studie von Hagforsen et al. (2007) ⁷³: Sie konstruierten eine cDNA-Expressionsbibliothek aus gesunder Kopfhaut, identifizierten daraus ebenfalls mittels rekombinanten Expressions-Cloning potentielle Autoantigene und ließen sie mit den Seren von Patienten mit verschiedenen Psoriasis-Typen reagieren. Abgesehen von Keratin 13, unterschieden sich jedoch die gefundenen Autoantigen-Kandidaten verglichen zu denen in der Studie von Jones et al. (2004).

Desweiteren konnten Besgen et al. (2010) kürzlich Ezrin, Maspin, Peroxiredoxin 2 und das Hitzeschock-Protein 27 (HsP27) als weitere Autoantigen-Kandidaten identifizieren. Diese, den Proteinen von Streptokokken ebenfalls sehr ähnlichen Proteine, lösten eine erhöhte T-Zell-Aktivierung bei HLA-Cw6 positiven Psoriasis-Patienten aus. Der überwiegende Teil der in dieser Studie generierten Antigen-spezifischen Zelllinien bestand interessanterweise aus CD8+ T-Zellen mit nahezu den identischen beta-Ketten TCR-Rearrangements, wie sie auch in den angereicherten Zellen der entsprechenden Psoriasis-Läsionen gefunden wurden ⁷⁴.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die Psoriasis heutzutage als eine vor allem durch autoreaktive T-Lymphozyten vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen wird, wobei die verantwortlichen Subpopulationen von T-Zellen und ihre potentiellen Autoantigene stets kontrovers diskutiert werden. Ferner ist durch die Anwendung verschiedener Methoden ein relativ breites Spektrum potentieller Autoantigen-Kandidaten entstanden. Demzufolge wäre es eine Bereicherung für die Wissenschaft, durch die Etablierung einer validen Methode die Identität der Psoriasis-triggernden Autoantigene und die verantwortlichen T-Zell-Subpopulationen weiter eingrenzen zu können. Dies sollte zum besseren Verständnis der Pathogenese und zum Erarbeiten optimierter Behandlungsansätze bei dieser häufigen Hauterkrankung beitragen.

3 Herleitung der Aufgabenstellung und Zielstellungen dieser Arbeit

Der aktuellen Evidenzlage ist zu entnehmen, dass sich bei einer Autoimmunerkrankung das Immunsystem in einem dysregulierten Zustand befindet und Mechanismen der Selbst-Toleranz überwunden worden sind. Grundsätzlich ist immer das gesamte Immunsystem bei der Entwicklung von autoimmunen Prozessen beteiligt. Dennoch gibt es bei einigen Autoimmunerkrankungen Hinweise darauf, dass bestimmte Effektorwege überwiegen. Dies trifft u.a. auch für die Hauterkrankung Psoriasis vulgaris zu, die höchstwahrscheinlich durch verschiedene Subpopulationen von T-Zellen vermittelt wird. Bei der Psoriasis bedingt ein Zusammenspiel von genetischer Veranlagung und bestimmten Umweltfaktoren, dass sich autoreaktive T-Zellen gegen gewisse Autoantigene bilden und deren Zerstörung einleiten. So wird heute neben den dermalen CD4+ T-Zellen insbesondere den epidermalen CD8+ T-Zellen eine kritische Rolle bei der Krankheitsentstehung zugeschrieben. Dafür sprechen u.a. gefundene Assoziationen zu bestimmten MHC-Klasse-I-Molekülen, wie z.B. HLA-Cw6 und HLA-A2 bei der Erkennung von potentiellen Autoantigenen³⁸⁻⁴¹, aber auch die jüngsten Berichte über aktivierte epidermale CD8+ T-Zellen in Psoriasis-Läsionen^{53,71}.

In mehreren Studien der letzten Jahrzehnte sind durch verschiedene Methoden bereits eine Vielzahl von potentiellen Autoantigen-Kandidaten gefunden worden. Allerdings ist für einige dieser Kandidaten noch unklar, ob und inwiefern sie eine Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen hervorrufen. Zudem widersprechen sich einige Studien in ihren Ergebnissen. Gemäß der Hypothese der Molekularen Mimikry konnte dies vor allem für bestimmte Zytokeratine gezeigt werden, wobei aufgrund der Ähnlichkeit zum M-Protein der Streptokokken am ehesten Keratin 17 (KRT17) als Autoantigen von u.a. CD8+ T-Zellen in der Psoriasis vermutet wird^{62,69,75}. Als ein weiterer potentieller Autoantigen-Kandidat wird z.B. Keratin 13 (KRT13) diskutiert, jedoch konnte bisher noch keine direkte Aktivierung von CD8+ T-Zellen durch KRT13 bewiesen werden^{72,73}. Neben den Zytokeratinen könnten aber noch viele weitere Autoantigene bei der Psoriasis vulgaris in Frage kommen^{64,65,72-74}.

Es fehlt eine valide Methode bzw. ein etabliertes Testsystem, mit dessen Hilfe man die T-Zell-Reaktion auf möglichst viele der gefundenen Autoantigene einheitlich untersuchen, miteinander vergleichen und näher beschreiben kann. Allerdings ist es komplizierter, die Existenz von autoreaktiven T-Zellen und das von ihnen erkannte Antigen nachzuweisen als das Vorliegen von

Autoantikörpern zu analysieren. Durch CD4+ T-Zellen erkannte Autoantigene lassen sich identifizieren, indem man Zellen oder Gewebe zu Kulturen von mononukleären Blutzellen gibt und die Aktivierung von CD4+ T-Zellen von Patienten mit der Autoimmunerkrankung testet. Die mononukleären Zellen nehmen die extrazellulären Proteine auf, verarbeiten sie intrazellulär in ihren Vesikeln und präsentieren die entstandenen Peptide auf ihrer Oberfläche über MHC-Klasse II-Moleküle ⁷⁶. Die Identifizierung von Autoantigenen von Autoimmunerkrankungen, bei deren Erkennung CD8+ T-Zellen beteiligt sind gestaltet sich noch etwas schwieriger. Bekanntlich müssen Peptide, die über MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, normalerweise von den Zielzellen selbst erzeugt werden. Zur Untersuchung von autoreaktiven CD8+ T-Zellen müssten folglich intakte Zellen aus dem Zielgewebe des Patienten (z.B. aus der Epidermis) verwendet werden ⁷⁶. Hierbei stößt die Forschung zu potentiellen Autoantigenen von CD8+ T-Zellen an seine Grenzen.

Die vorliegende Arbeit verfolgt die Idee, eine Methode zu etablieren, mit dessen Hilfe von Psoriasis-Patienten isolierte T-Zellen in ihrer Reaktion auf potentielle Autoantigene getestet werden können. Es soll deren Aktivierung durch verschiedene, bereits identifizierte Autoantigen-Kandidaten getestet, miteinander verglichen und näher untersucht werden. Kernpunkt dieses Testsystems stellt die Auswertung der in vitro CD8+ T-Zell-Reaktion von Patienten auf eine humane APC-Zelllinie dar, die stabil-transfizierte Autoantigen-Kandidaten bzw. Antigene über ein MHC-Klasse-I-Molekül präsentieren kann. Hierfür wurde die humane HLA-A2+ professionell antigenpräsentierende Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) ausgewählt. Um den beschriebenen Versuchsaufbau herzustellen, müssen jedoch zuvor noch einige andere Voraussetzungen geschaffen und daher als entsprechende Zielsetzungen formuliert werden:

Zunächst ist es notwendig, mögliche Autoantigen-Kandidaten als auch ein bekanntes Kontroll-Antigen auszuwählen, mittels PCR zu amplifizieren und deren vollständige Nukleotidsequenzen in ein Expressionsvektorsystem (hier: piggyBacTm-Transposon Expressionsvektorsystem mit Transposase) zu klonieren. Als potentielle Autoantigen-Kandidaten wurden nach intensiver Literaturrecherche KRT17 ^{63,75} und KRT13 ^{72,73} gewählt. Als Kontroll-Antigen diente die Nukleotidsequenz des humanen Zytomegalievirus-(CMV)-Antigens pp65, das hauptsächlich für die Immunantwort von CD8+ T-Zellen bei einer CMV-Infektion verantwortlich ist ⁷⁷. Anschließend sollen mittels stabiler Transfektion und darauffolgender mehrmaliger durchflusszytometrischer Zellsortierung humane HLA-A2+ T1 Zelllinien etabliert werden, die jeweils die klonierten Antigene stabil exprimieren.

Zur Überprüfung des geschaffenen Systems gilt es zunächst, die Fähigkeit der mit dem pp65-Antigen stabil-transfizierten APC-Zelllinie, CD8⁺ T-Lymphozyten von HLA-A2⁺ /CMV-seropositiven Probanden antigenspezifisch zu stimulieren, zu untersuchen. Dies soll mittels einer durchflusszytometrischen Analyse der Expression ausgewählter Aktivierungsmarker auf der Oberfläche der CD8⁺ T-Zellen sowie der Beurteilung des Proliferationsverhaltens nach Stimulation mit den entsprechenden T1 Zelllinien geschehen. Nach der Etablierung soll dieses Testsystem schließlich auch bei HLA-A2⁺ Psoriasis-Patienten und gesunden HLA-A2⁺ Probanden angewendet werden, indem die CD8⁺ T-Zell-Reaktion auf die mit den beiden Zytokeratinen (KRT17 und KRT13) stabil-transfizierten T1 Zelllinien ausgewertet wird.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Labormaterialien

Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	(Eppendorf)
Schraubverschlussreaktionsgefäße 15ml,50ml	(BD Falcon®)
Pipetten 2 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	(Eppendorf)
Pipettenspitzen 5µl, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Labor
Pipetboy acu	(Integra Biosciences)
Glaspipetten 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	(BD Falcon®)
Agarmediumplatten steril	(Sarstedt)
PCR Reaktionsröhrchen	(Biozym Scientific)
Durchflusszytometrie-FACS-Röhrchen	(BD Falcon®)
Casy® Röhrchen	(Innovatis)
CryoTube™ Vials	(Thermo Scientific)
Nalgene Mr. Frosty Freezing Container	(Thermo Scientific)
Well-Platten 96 well, 48 well, 24 well, 12 well, 6 well	(Greiner bio-one)
Erlenmeyerkolben 250ml	(VWR)
Blutabnahmeset	(BD Vacutainer®)
Verbandsmaterialien:	Pur-Zellin (Hartmann), Durapore™
Skalpell	

4.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Agarose	(SERVA)
4',6 - Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	(SERVA)
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	(Labor)
CD3 Micro Beats	(MACS, Miltenyi Biotec)
GelRed™	(BIOTIUM)

Ethanol 100%, 70%	(Roth)
Ficoll 400	(PAA)
Flebogamma [®]	(Labor, Rheumatologie Charité)
NucleoSpin [®] Extract II	(Macherey Nagel)
Plasmid DNA Purifikation	(Macherey Nagel)
aufgereinigtes DEPC Wasser	(Ambion)
GenRuler DNA Ladder Mix	(Fermentas)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	(Thermo Scientific)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	(Fermentas)
Amaya [®] Cell Line Nucleofector Kit C	(Lonza)
L-Broth-Agar	(MP Biomedicals)
LB Medium Kapseln	(Krackeler Scientific Inc.)
Ampicillin Natriumsalz (50µg/ml)	(Roth)
Kanamycin (50µg/ml)	(Roth)
Phytohämagglutinin (PHA) (1mg/ml)	(Innere Medizin Charité Mitte)
Puromycin (0,4µg/ml)	(Roth)
Chloramphenicol (30µg/ml)	(Roth)
1% Penicillin/Streptomycin	(Biochrom)
IMDM Medium, RPMI Medium	(Invitrogen)
Fetales Kälber Serum (fetal calf serum) FCS	(Lonza)
AB Serum	(Lonza)

4.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
PBS pH 7,2-7,4 (Phosphat-gepufferte Saline)	1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl) 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 137 mM Natriumchlorid (NaCl)
10x BSA	Rinderserumalbumin (NEB)
PBS/BSA (bzw. PBS/BSA/Azid) (PBS mit 0,5% w/v BSA)	5g/l BSA in PBS
Lysepuffer	50mM TRis HC pH 8,0, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS
Gelelektrophoresepuffer	1x TAE Puffer

6x Ladebuffer für Gelelektrophorese	0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 15 % (w/v) Ficoll 400 (Thermo scientific)
1% Agaroselösung	1g Agarose (SERVA) in 100µl 1xTAE Puffer
Enzympuffer	NEB Puffer 1, 2, 3, 4; 10X T4 DNA Ligase Puffer

4.1.4 Geräte

Autoklav	(Webeco Serie EC)
Brutschrank Bakterienkultur	(Memmert)
Brutschrank Zellkultur	(New Brunswick Scientific)
Bunsenbrenner	(Campinggaz)
Feinwaage	(OHAUS)
Vortexer	(LABINCO)
Apparatur zur magnetischen Separation mit Trennsäulen	(MACS, Miltenyi Biotec)
PCR-Thermocycler	(Eppendorf Mastercycler personal)
Elektrophoresekammer	(peq Lab)
Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappe	(BD Biosciences Falcon™)
Wasserbad:	(STAR LAB)
UV-Lichtgerät mit Kamera:	NightHawk (Berthold technologies)
Durchflusszytometer:	FACSCanto II, FACSLSR II (BD, Deutschland); Zell-Sorter: FACSAria II Cell Sorter (BD)
Zellzählgerät	Casy® Modell TT
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	(Produkt aus der ehemaligen DDR)
Spektrophotometer	Nano Drop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)
Zentrifugen:	Microfuge 16 (Beckman Coulter) Allegra® x-15R (Beckman Coulter)
Sterilwerkbank	(Thermo Scientific)
Lichtmikroskop mit Fotosoftware	(Motic AE31)
Fluoreszenzmikroskop AXIO Vision	(Zeiss)
Mikrowelle	(Gourmet wave)
Elektroporator:	Amaxa™ Nucleofactor™ (Lonza)

4.1.5 Enzyme

Pfu DNA Polymerase 3u/μl	(Promega)
T4 DNA Ligase 5u/μl	(Fermentas)
Proteinase K	(Roche)

Mit folgenden Restriktionsenzymen der Firma New England Biolabs (NEB) wurde gearbeitet: AatII, Acc65i, AvrII, BamHI, BgIII, BsrGI, HindIII, SacI, XbaI, XhoI, XmaI

4.1.6 Antigene und Reporter

Die Antigene und Reporter wurden aus bestellten bzw. bereits im Labor etablierten Antigen-tragenden Plasmiden (Tabelle 2) amplifiziert und in die Expressionsvektoren kloniert. Zur Analyse der Nukleotidsequenzen und Darstellung bzw. Bearbeitung der Plasmide wurden die im Internet frei verfügbaren Programme ApE (A plasmid Editor by M. Wayne Davis) und Serial Cloner (Softonic) verwendet.

Tabelle 2: Plasmide zur Amplifikation der Antigene

Plasmid	Resistenzgen	Vertrieb
PGK-H2B-mCherry	Ampicillin	Addgene
pCDNA6-pp65	Ampicillin	Prof. B. Plachter, Institut für Virologie Mainz
Pdonr221-Keratin 17	Kanamycin	PlasmID Database HsCD00043118
pOTB7-Keratin 13	Chloramphenicol	PlasmID Database HsCD00325553

4.1.7 Expressionsvektoren

Das in den Abbildungen 1, 2 und 3 dargestellte piggyBacTm-Transposon Expressionsvektorsystem (pPB) mit dem Enzym Transposase (mPB) wurde uns freundlicherweise von Prof. Manfred Gossen (BCRT) zur Verfügung gestellt und diente als Grundlage für die weiteren Klonierungsschritte bzw. zur späteren Einschleusung der klonierten Antigene in die Zelllinie T1. Nach gemeinsamer Transfektion eines piggyBacTm Expressionsvektors mit der Transposase (mPB), schneidet das Enzym spezifisch an den Transposons (ITRs, engl. Inverted Terminal Repeat sequences) des piggyBacTm Expressionsvektors und integriert die Promotoren mit kloniertem Antigen bzw. Reporter stabil,

aber ungerichtet in das Genom der Zellen⁷⁸ („cut and paste“-Mechanismus). Nähere Information zu diesem System sind auch auf der Internetseite der Firma „System Biosciences“ zu finden (www.systembio.com). Die Antigene pp65, KRT17 und KRT13 sollten jeweils in die durch den humanen hEF1-Promotor gesteuerte Multiple Cloning Site (MCS) bzw. Polylinker-Region des Expressionsvektors pPB-MCS-Puro kloniert werden. Als Reporter gen dieses piggyBacTm-Expressionsvektors dient eine Resistenz gegen das Nukleosid-Antibiotikum Puromycin (Puro), die dem viralen CMV-SV40 Promotor unterliegt. Zur Expressionskontrolle stabil-transfizierter Zellen sollte der Vektor pPB-eGFP-Puro verwendet werden, der neben einer Puromycin-Resistenz bereits in der MCS die klonierte Nukleotidsequenz (720 bp, bp=Basenpaare) des im blauen Licht grün fluoreszierenden Proteins eGFP (engl. enhanced Green Fluorescent Protein) enthält⁷⁹. Im Verlauf der Experimente wurden die piggyBacTm-Expressionsvektoren durch mehrere Klonierungsschritte verändert.

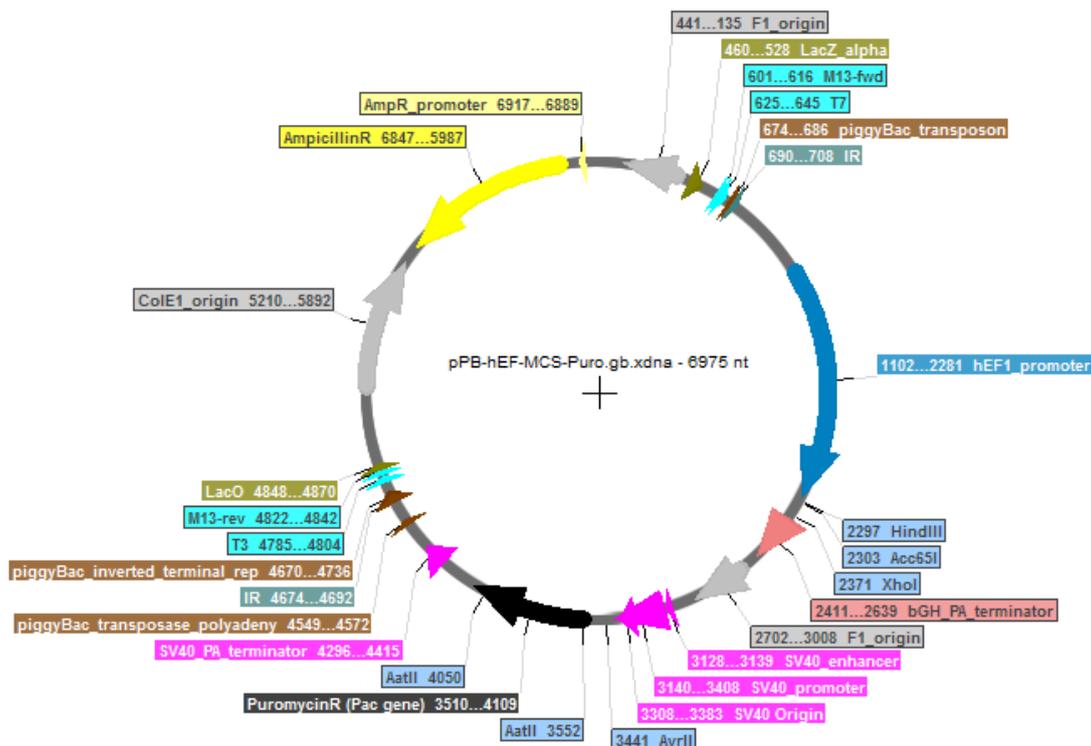


Abbildung 1: Vektorkarte des piggyBacTm-Expressionsvektors pPB-MCS-Puro (Prof. M. Gossen, BCRT). Dargestellt sind u.a. die für die späteren Klonierungen der Antigene bzw. Reporter wichtigen Schnittstellen ausgewählter Restriktionsenzyme in der Multiple Cloning Site MCS (HindIII, Acc65I und XhoI) bzw. in der Nähe des Puromycin-Resistenz-Gen-Reporters (AatII und AvrII).

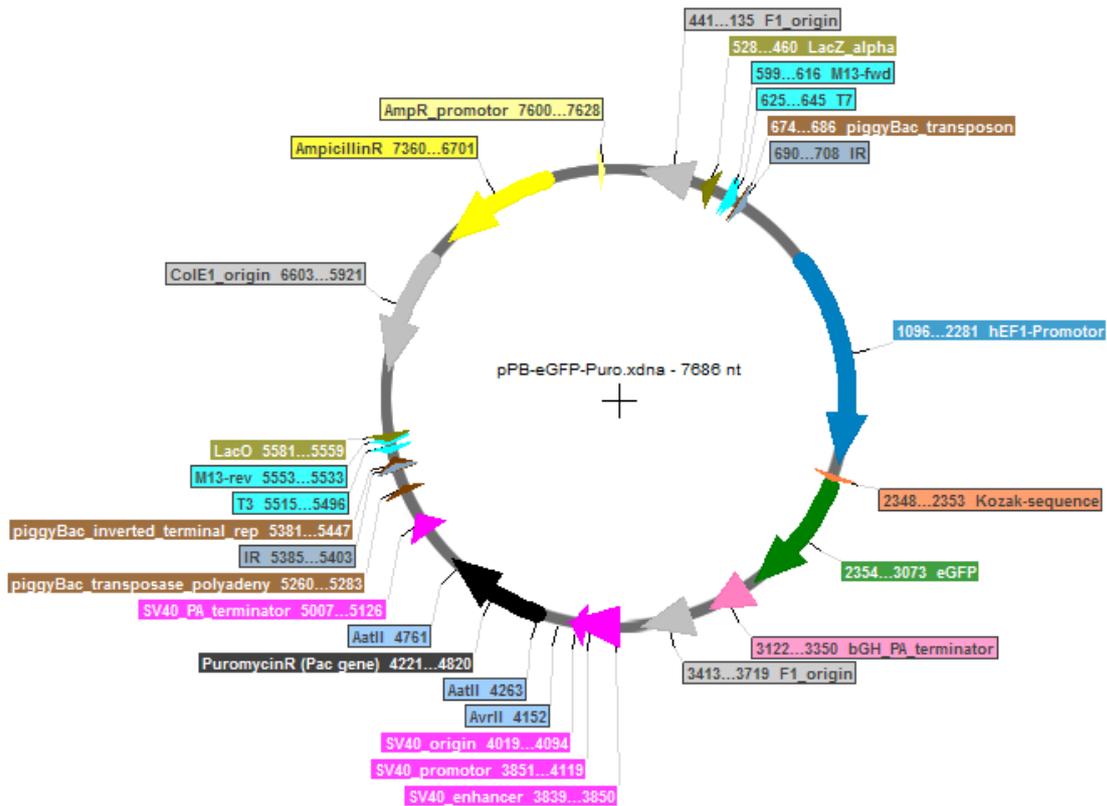


Abbildung 2: Vektorkarte des zur Expressionskontrolle geeigneten piggyBacTm-Expressionsvektors pPB-eGFP-Puro (Prof. M. Gossen, BCRT). Dargestellt sind u.a. die für die spätere Klonierung wichtigen Schnittstellen der Restriktionsenzyme AatII und AvrII, die das Puromycin-Resistenzgen (Pac-Gen) flankieren.

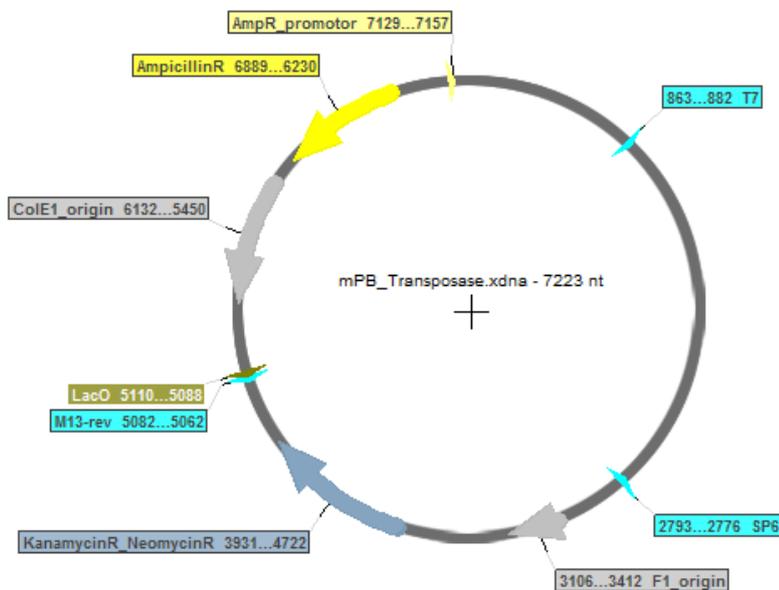


Abbildung 3: Vektorkarte des Enzyms piggyBacTm Transposase mPB (Prof. M. Gossen, BCRT). Nach gemeinsamer Transfektion mit einem piggyBacTm-Expressionsvektor schneidet das Enzym den Expressionsvektor spezifisch an den Transposons und integriert den DNA-Abschnitt stabil, aber ungerichtet in das Genom der Zellen.

4.1.8 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR-Primer (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction) wurden anhand der zu vervielfältigenden DNA-Sequenzen entworfen und im Hinblick auf die nachfolgenden Klonierungsschritte mit Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme erweitert (Tabelle 3). Alle PCR-Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL Berlin hergestellt.

Tabelle 3: Verwendete PCR-Primer

<i>Gen</i>	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse-Primer</i>
eGFP und mCherry	eGFP/mCherry-AvrII-For TAACCTAGGAGCCACCATG GTGAGCAAGGG	eGFP/mCherry-AatII-Rev TAAGACGTCATTACTTGTAC AGC
pp65 (CMV)	pp65-Acc65I-For TAAGGTACCAGCCACCATG GAGTCGCGC	pp65-XHOI-Rev TAACTCGAGATCAACCTCGG TGC
Keratin 17 (KRT17)	KRT17-HindIII-For TAAAAGCTTAGCCACCATG ACCACCTCC	KRT17-XHOI-Rev TAACTCGAGATCAGCGGGTG GTCTG
Keratin 13 (KRT13)	KRT13-HindIII-For TAAAAGCTTAGCCACCATG AGCCTCCG	KRT13-Acc65I-Rev TAAGGTACCATTAAGGCCTA CGGAC

4.1.9 Primer zur Sequenzierung

Die folgenden zur Sequenzierung der Vektoren benutzten Primer (Tabelle 4) wurden mit Hilfe des auf der Internetseite <http://primer3.sourceforge.net/> frei verfügbaren Programms Primer3 entworfen und über die Firma Eurofins MWG Operon herstellen lassen. Dazu wurden die Plasmid-DNA-Proben in der angegebenen Konzentration eingeschickt und nach Sanger et al. (1977) sequenziert⁸⁰.

Tabelle 4: Primer zur Sequenzierung

Plasmid	Zielsequenz	Forward Primer	Reverse Primer
pPB-CAGdelta+pl+hEF-eGFP-mCherry (pPB-eGFP-mCherry)	eGFP	TGGAATTTGCCCTTTTT GAG	GATGGCTGGCAACTA GAAGG
	mCherry	CCCCATGGCTGACTAA TTTT	CGAAGCCCAACCTTTC ATAG
pPB-CAGdelta+pl+hEF-MCS-eGFP	MCS	TGGAATTTGCCCTTTTT GAG	GATGGCTGGCAACTA GAAGG

(pPB-MCS-eGFP)	eGFP	CCCCATGGCTGACTAA TTTT	CGAAGCCCAACCTTTC ATAG
pPB-CAGdelta+pl+hEF-pp65-eGFP (pPB-pp65-eGFP)	pp65 eGFP	TGGAATTTGCCCTTTTT GAG CCCCATGGCTGACTAA TTTT	GATGGCTGGCAACTA GAAGG CGAAGCCCAACCTTTC ATAG
pPB-CAGdelta+pl+hEF-KRT17-eGFP (pPB-KRT17-eGFP)	KRT17 eGFP	TGGAATTTGCCCTTTTT GAG CCCCATGGCTGACTAA TTTT	GATGGCTGGCAACTA GAAGG CGAAGCCCAACCTTTC ATAG
pPB-CAGdelta+pl+hEF-KRT13-eGFP (pPB-KRT13-eGFP)	KRT13 eGFP	TGGAATTTGCCCTTTTT GAG CCCCATGGCTGACTAA TTTT	GATGGCTGGCAACTA GAAGG CGAAGCCCAACCTTTC ATAG

4.1.10 Angaben zur verwendeten Zelllinie

Bei der für die Experimente verwendeten Zelllinie handelt es sich um die auf B- und T-Lymphozyten basierende humane antigenpräsentierende Suspensionszelllinie 174xCEM.T1 (T1). Die Zelllinie T1 wurde bei der Firma ATTC[®] über die Katalognummer ATTC[®] CRL-1991[™] bestellt. Nach Angaben von Salter RD et al. (1985) ist diese Zelllinie ein kloniertes Hybrid der Zelllinie 721, einer Variante der B-lymphoblastischen Zelllinie LCL 721 und der CEM T-lymphoblastischen Zelllinie CEMR.3⁸¹. T1 kann zur Untersuchung der Prozessierung von Antigenen in T-Zell-Reaktionen basierend auf MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen verwendet werden. T1 exprimiert insbesondere HLA-A2 und -DR7, aber auch -Aw30, -B5, -Bw4, -Bw6 und CD7 auf ihrer Oberfläche⁸¹. Im Verlauf der Experimente wurde die ursprüngliche Zelllinie T1 mit verschiedenen Antigen- und Reporter-tragenden piggyBac[™]-Expressionsvektoren stabil transfiziert und somit unterschiedliche T1 Zelllinien etabliert.

4.1.11 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 5: Antikörper und Fluorochrome zur Oberflächenfärbung der T1 Zelllinien

<i>Antikörper</i>	<i>Fluorchrom/Konjugat</i>	<i>Vertrieb/Klon</i>	<i>Verdünnung</i>
CD3	Cy5	Labor/UCHT-1	1:300
CD19	PE-Cy7	Biologend/HIB19	1:10
CD40	PE	BD	1:50
CD69	APC-Cy7	BD/mlgG1	1:50

CD80	PE	Biolegend/2D10	1:50
CD83	APC	Biolegend/HB15e	1:50
CD86	FITC	BD/B70/B7-2	1:100
HLA-A2	FITC	BD/BG 7.2	1:200
HLA-DR	PE-Cy7	BioLegend/L243	1:10

Tabelle 6: Antikörper und Fluorochrome zur Oberflächenfärbung der Spender-T-Zellen

Zielmolekül	Fluorochrom/Konjugat	Vertrieb/Klon	Verdünnung
CD3	Pacific Blue	BD Pharmingen/ UCHT-1	1:100
CD4	APC-Cy7	BD Pharmingen/ RPA-T4	1:100
CD8	Pacific Orange	Invitrogen/3B5	1:50
CD25	APC	Immunotools/ MEM-181	1:50
CD137 (4-1BB)	PE-Cy7	BioLegend/4B4-1	1:10
HLA-A2	FITC	BD/BG 7.2	1:200

4.2 Methoden

4.2.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen der gewonnenen Plasmid-DNA-Proben bzw. DNA-Fragmente wurden mit dem Nano Drop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) ermittelt. Zur Konzentrationsbestimmung wird 1µl der Probe benötigt. Die DNA-Konzentration der Probe wird bei einer Wellenlänge von 260nm photometrisch bestimmt.

4.2.2 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen und hydrolysieren doppelsträngige DNA sehr spezifisch an palindromen Sequenzen. In Abhängigkeit vom verwendeten Enzym können dabei entweder nicht-klebende Enden (engl. blunt ends) oder klebende Enden (engl. sticky ends) entstehen, wobei die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme ausschließlich klebende 3' bzw. 5' Enden erzeugen. Um 0,2µg DNA zu schneiden, wurden 5 units des entsprechenden Restriktionsenzym in einem Gesamtansatz von 10µl verwendet. Die hinzuzufügenden Puffer bzw. Zusätze von BSA wurden aus den Herstellerangaben (NEB) entnommen und der Restriktionsansatz bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde zur

Klonierung von PCR-DNA Produkten in Expressionsvektoren und zum Testen von Plasmiden bzw. klonierten Expressionsvektoren angewendet.

4.2.3 Transformation von Plasmiden in kompetente E. coli

Der Begriff Transformation beschreibt in der Molekularbiologie die nicht-virale Übertragung von freier DNA (hier Plasmid-DNA) in u.a. kompetente Bakterienzellen mit dem Ziel, das eingebrachte Erbmateriale zu vervielfältigen.

Zur Transformation der Plasmide wurden 10 bis 50µl kompetente E. coli (One Shot[®] Top 10, Invitrogen[™]) aus -80°C Lagertemperatur zunächst für 5 Minuten auf Eis zum Schmelzen gebracht. Danach wurden zügig ca. 20ng des zu transformierenden Plasmids auf die Bakterien pipettiert und das Röhrchen für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 40 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien sofort wieder für 3 Minuten auf Eis gelagert und im Anschluss für 30 Minuten in 250µl LB-Medium im Bakterieninkubator bei 37°C geschüttelt und inkubiert. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien wurden 200µl des Gemisches aus LB-Medium und Bakterien auf eine Agarmediumplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum-Zusatz ausplattiert. Nach 18 bis 20-stündiger Inkubation im Bakterieninkubator bei 37°C konnten Kolonien der transformierten Klone auf der Agarmediumplatte entnommen und durch erneute Inkubation bei 37°C über 15 Stunden in mit entsprechendem Antibiotikum versetzten LB-Medium weiter vermehrt werden. Schließlich wurden die Plasmide aus den Bakterienkulturen mittels einer Miniprep (siehe Plasmid DNA Purifikation, Macherey Nagel) isoliert.

4.2.4 Gelelektrophorese

In der Gelelektrophorese können verschieden große DNA-Fragmente einer Probe aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld ihrer Länge nach in einem Agarose-Gel aufgetrennt werden. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1g Agarose in 100ml 1xTAE Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Zugabe von 5µl GelRed[™] wurde das Agarosegel in einen Gelelektrophoreseschlitten mit Platzhalter für die Geltaschen gegossen und für 15 Minuten ausgehärtet. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TAE Puffer verwendet. Die DNA-Fragmente wurden mit 6x Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen aufgetragen und für 50 bis 90 Minuten bei 120V und 400mA im Gel aufgetrennt. Anschließend

wurde das Gel im UV-Licht mit dem Gerät Nighthawk fotografiert und über die Software Hawkview digital weiterverarbeitet. In dieser Arbeit diente die Gelelektrophorese zur Darstellung der Größe und Weiterverarbeitung von DNA-Fragmenten nach einer Polymerase-Kettenreaktion bzw. einem Restriktionsverdau. Zur Klonierung wurden die Fragmente aus dem Agarosegel manuell unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten und mit dem NucleoSpin[®] Extract II (Macherey Nagel) isoliert.

4.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction) nach Kary B. Mullis und Michael Smith können selbst geringste Mengen von DNA-Material exponentiell vervielfältigt werden. Allerdings müssen dafür der Anfang und das Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes bekannt sein. Als Starthilfe für die Reaktion dienen Oligonukleotidprimer, d.h. kurze, einzelsträngige und komplementär zu den Enden des zu vervielfältigenden Abschnitts synthetisierte DNA-Fragmente. In einem Thermocycler lagern sich die Primer bei geeigneter Temperatur an die Enden der einzelsträngigen DNA-Matrize (Template) an (Annealing) und werden unter passenden Reaktionsbedingungen durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in Gegenwart von Desoxyribonukleotiden, Enzympuffer und Magnesiumchlorid komplementär verlängert (Elongation). Folglich werden auf diese Weise neue DNA-Stränge synthetisiert, deren Sequenzen komplementär zur Matrize sind. Die Wiederholung dieses Vorganges für mehrere Zyklen führt schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-Materials. Die PCR wurde in dieser Arbeit zur Amplifikation der Antigene bzw. Reporter für die Klonierungen und zur Untersuchung des Genoms der mit den piggyBacTm-Transposon Expressionsvektoren transfizierten T1 Zelllinien angewendet.

Tabelle 7: PCR-Ansatz (25µl):

H2O	15µl
10x Pfu Puffer (Promega)	2,5µl
dNTPs	4µl
MgCl ₂	1,25µl
Pfu- DNA- Polymerase (Promega 3u/µl)	0,25µl
Primer For (10mM)	0,5µl
Primer Rev (10mM)	0,5µl
DNA Template (20ng)	1µl

Tabelle 8: PCR Thermocycler-Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion	
1	95°C	5 min	Aufheizen	
2	95°C	1 min	Denaturierung	
3	55-65°C	1 min	Annealing	
4	72°C	2 min	Verlängerung	Rücksprung auf Schritt 2, 35 Zyklen
5	72°C	10 min		
Halten	4°C	-		

4.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation verknüpft das Enzym Ligase die 3' Hydroxyl- und 5' Phosphat-Enden zweier DNA-Fragmente unter ATP-Verbrauch durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Die Reaktion diente in dieser Arbeit zur Klonierung, d.h. zum Einbringen von DNA-Inserts in geschnittene (linearisierte) Expressionsvektoren. Da ausschließlich mit klebrigen, d.h. überhängende Enden erzeugenden, Restriktionsenzymen gearbeitet wurde, mussten die jeweiligen 3' und 5' Enden von geschnittenem Expressionsvektor und DNA-Insert zueinander komplementär sein. Deswegen wurden die Enden zuvor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten.

Tabelle 9: Ligationsansatz 10µl

Geschnittene Vektor DNA	20-40ng
Geschnittenes PCR Fragment (Insert)	50ng
10X T4 DNA Ligase Puffer	1µl
T4 DNA Ligase 5u/µl	1µl

Der Ligationsansatz (Tabelle 9) wurde für 24 Stunden bei 17°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente E. coli. Die Plasmid-DNA der potentiellen Klon-Bakterien-Kolonien wurde isoliert und die positiven Klone über Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

4.2.7 Kultivierung von Zellen

4.2.7.1 Einfrieren und Auftauen der T1 Zelllinien

Zum Einfrieren wurden 1×10^6 - 1×10^7 Zellen in einer Gefrierlösung mit 900 μ l FCS und 100 μ l DMSO aufgenommen und zunächst bei -80°C eingefroren. Nach 24 bis 72 Stunden wurden die Röhrchen bei -200°C in flüssigen Stickstoff überführt und aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen in den Röhrchen durch Handwärme zügig aufgetaut und anschließend in Zellkulturflaschen mit 9 ml warmem (37°C) IMDM Medium (10% FCS, 1% P/S) ausgesät.

4.2.7.2 Zellkulturbedingungen

Alle T1 Zelllinien wurden im Zellkultur-Brutschrank in Zellkulturflaschen bzw. Wellplatten mit IMDM Medium (+10% FCS, +1% Penicillin/Streptomycin) bei 37°C , 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 kultiviert. Nach Begutachtung der T1 Zelllinien im Lichtmikroskop wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 1×10^5 bis 1×10^7 Zellen/ml entsprechend alle 2-3 Tage geteilt bzw. das Medium der Zelllinien gewechselt.

4.2.8 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzählung der isolierten PBMC bzw. T-Zellen wurde das Gerät CASY[®] Cell Counter Modell TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) eingesetzt. Basierend auf der elektrischen Pulsflächenanalyse beim Durchtritt der Zellen durch die Messkapillare kann das Gerät nicht nur die Konzentration der gemessenen Zellprobe ausgegeben, sondern differenziert auch zwischen lebenden und toten Zellen anhand der unterschiedlichen Zellgrößen.

Die Zellen der einzelnen T1 Zelllinien wurden aufgrund ihrer Größe mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt.

4.2.9 DNA-Isolation aus den T1 Zelllinien

Zur Isolation der genomischen DNA wurden pro T1 Zelllinie auf jeweils 2×10^7 pelletierte Zellen 275 μ l TNES/Lysepuffer und 25 μ l Proteinase K gegeben und die Proben bei 26°C und 300 rpm (engl. rounds per minute) für 2 Stunden geschüttelt. Dies führte zur Auflösung der Zellmembran und Freisetzung der Nukleinsäuren in den Zellen. Nach Inaktivierung der Proteinase K durch die fünfminütige Erhitzung bei 99°C wurden die einzelnen Proben mit jeweils 420 μ l

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gut gemischt und die obere, d.h. die Nukleinsäuren enthaltene Phase in ein neues Reaktionsröhrchen übertragen. Die Fällung der DNA erfolgte unter Hinzugabe von 600µl 100% Ethanol bei Raumtemperatur und mehrmaligen invertieren. Danach wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Proben jeweils noch einmal mit 500µl 70% Ethanol (4°C) versetzt und invertiert. Schließlich wurden die Proben ein letztes Mal zentrifugiert, die Überstände sorgfältig abgegossen und die DNA-Pellets in DEPC-Wasser resuspendiert.

4.2.10 Transfektion der Zelllinie T1 mit den Expressionsvektoren

Unter dem Begriff Transfektion versteht man verschiedenste Verfahren, um genetisches Material in eine eukaryotische Zelle einzubringen. In dieser Arbeit wurde zur Transfektion die Methode der Elektroporation gewählt, bei der die Membran der Zellen durch ein von einem Kondensator erzeugtes Spannungsfeld vorübergehend permeabel wird und das genetische Material über entstandene Poren von außen in die Zelle gelangen kann. Allerdings stirbt auf diese Weise auch ein großer Teil der Zellen. Zur Elektroporation der T1 Zellen wurde das Gerät AmaxaTm NucleofectorTm verwendet und sich an dem von der Firma Lonza gegebenen Protokoll für T2 Zellen orientiert. Pro Ansatz wurden 2×10^6 T1 Zellen mit insgesamt 2µg Plasmid DNA (1,6µg piggyBacTm Expressionsvektor, 0,4µg Transposase Enzym) in 100µl Nucleofector Lösung C über das Nucleofector Programm A-030 in einer Küvette elektroporiert. Im Anschluss wurde der Ansatz zügig in eine vorgewärmte 12 Well-Platte mit jeweils 2ml IMDM Medium (+FCS, + Penicillin/Streptomycin) überführt, für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und danach das Medium gewechselt.

4.2.11 Blutabnahme von HLA-A2+/CMV-sero-positiven Spendern bzw. Psoriasis-Patienten und gesunden HLA-A2+ Kontroll-Probanden

Für die Etablierungsexperimente mit u.a. der Zelllinie T1-pp65-GFP wurden von sechs freiwilligen gesunden HLA-A2+/CMV-sero-positiven Labormitarbeitern (3 Frauen/ 3 Männer) jeweils 40ml venöses Vollblut in Serumröhrchen abgenommen.

Die Blutabnahme bei den Psoriasis-Patienten erfolgte auf freiwilliger Basis in der Hautarztpraxis von Frau Dr. med. Heidi Buttgerit. Zu den Einschlusskriterien für die Auswahl der Patienten zählten deutlich sichtbare Psoriasis-Plaques auf der Haut bei einer möglichst topischen bzw.

milden immunmodulierenden Therapie. Zur Ermittlung des Schweregrades der Ausprägung der Psoriasis-Erkrankung wurde der PASI-Score (Erstbeschreiber: Fredriksson und Petterson, 1978, engl. Psoriasis Area and Severity Index) herangezogen⁸². Nach Aushändigung einer Teilnehmerinformation und Unterschrift auf der Einverständniserklärung wurden an vier Tagen von insgesamt 15 Psoriasis-Patienten jeweils 40ml venöses Vollblut in Serumröhrchen abgenommen. Im Labor erfolgte anschließend die HLA-A2-Typisierung der Psoriasis-Patienten. Als Gesund-Kontrollen (3 Frauen/ 3 Männer) dienten zum einen zwei der HLA-A2+ CMV-seropositiven Spender, zum anderen aber auch vier weitere gesunde freiwillige HLA-A2+ Probanden aus dem Labor.

4.2.12 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Die Isolierung von PBMC (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell) aus dem entnommenen venösen Vollblut der Spender erfolgte über Dichtegradientenzentrifugation. Dabei lassen sich die PBMC aufgrund ihrer Dichte mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten von den Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen trennen. Zunächst wurde das Vollblut mit PBS im Verhältnis 1:3 verdünnt und auf Ficoll-PaqueTm (12,5ml) geschichtet. Nach einem ersten Zentrifugationsschritt bei 800g* (ohne Bremse, 20min, Raumtemperatur) wurde die sichtbare PBMC-Bande entnommen, in ein anderes Schraubverschlussreaktionsgefäß überführt und bei 310g* für 8min zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand verworfen und das PBMC-Pellet in 720µl PBS/BSA zur weiteren Bearbeitung aufgenommen.

* g = Zentrifugalkraft (Vielfaches der Erdbeschleunigung/Erdbeschleunigungskraft)

4.2.13 Magnetische Zellsortierung von T-Zellen aus PBMC

Bei der magnetischen Zellsortierung (MACS, engl. Magnetic Activated Cell Separation) können Zellen durch die Markierung mit bestimmten Antikörpern, an die Magnetpartikel gebunden sind, getrennt werden. Die aus magnetisch markierten und nicht-markierten Zellen bestehende Zellsuspension wird über eine Trennsäule gegeben, die von einem permanenten Magnetfeld umgeben ist. Folglich durchlaufen nur die nicht-magnetisch markierten Zellen die Säule, während die magnetisch markierten Zellen in der Säule bleiben und separat außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden können. Durch dieses Prinzip kann die magnetische Zellsortierung zur Anreicherung oder zum Ausschluss (Depletion) einer magnetisch markierten Zellpopulation aus einem Zellgemisch verwendet werden. Vor der magnetischen Zellsortierung wurden die

PBMC zur Reduktion von unspezifischen Bindungen zunächst für 10min auf Eis in 800µl PBS mit Flebogamma[®] (Verdünnung 1:10) geblockt, anschließend mit 200µl CD3 Micro Beads (MACS, Miltenyi Biotec) versetzt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die PBMC (Original) auf eine erste magnetische Trennsäule gegeben und die sortierten T-Zellen außerhalb des Magnetfeldes aus der Säule eluiert (Positiv-Fraktion). Zur Erhöhung der Reinheit der sortierten T-Zellen wurde die Positiv-Fraktion erneut über eine zweite magnetische Trennsäule gegeben und außerhalb des Magnetfeldes eluiert.

4.2.14 Analyse des Proliferationsverhaltens von T-Zellen durch Anfärben mit CFSE

Der grün fluoreszierende Farbstoff CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) ist ein membranpermeabler Ester und wird häufig zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Zellen verwendet. In der Zelle wird es durch Esterasen hydrolysiert, so dass das Molekül seine Permeabilität verliert. Durch eine kovalente Bindung an Proteine verbleibt es zudem irreversibel im Zytosol der Zelle. Teilt sich eine Zelle, so teilt sich folglich auch der CFSE-Anteil auf die zwei entstandenen Tochterzellen auf, d.h. der Fluoreszenzgehalt dieser Zellen halbiert sich mit jeder weiteren Teilung. Dies kann im Durchflusszytometer zur Messung der Zellteilungsrate bzw. Proliferation genutzt werden. Zur CFSE-Markierung wurden 1×10^7 T-Zellen in 2ml PBS mit 5mM CFSE (Verdünnung von 1:16000) für 3,5min im Dunkeln inkubiert, danach mit RPMI Medium aufgefüllt, zentrifugiert und das Zell-Pellet schließlich in RPMI Medium aufgenommen.

4.2.15 Stimulation der T-Zellen durch die transfizierten T1 Zelllinien

Zur Stimulation wurden jeweils 5×10^5 Spender-T-Zellen mit 1×10^5 Zellen der entsprechenden T1 Zelllinien in einer 96 Rund-Well-Platte in 200µl RPMI Medium (+1% Penicillin/Streptomycin und 10% AB) für 72h bei 37°C im Zellkulturschrank inkubiert. Als Kontrollen dienten die Reaktionen der Spender-T-Zellen auf die untransfizierte Zelllinie T1, die mit Antigen-leerem Vektor transfizierte Zelllinie T1-MCS-eGFP und die isolierten Spender-T-Zellen alleine. Als Positivkontrolle wurden die Spender-T-Zellen mit 1µl einer 1mg/ml Stammlösung Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert.

4.2.16 Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Zur Färbung wurden die Zellen aus der 96 Well-Platte in Reaktionsgefäße überführt, bei 310g* für 8min zentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Zellpellets in 50µl PBS/BSA/Azid mit 1:10 Flebogamma® für 10min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in einem Cocktail (jeweils 50µl) von mit Fluorochromen konjugierten monoklonalen Antikörpern resuspendiert (Färbevolumen 100µl) und die Proben für 10min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die gefärbten Zellen in 2ml PBS/BSA (310g*, 8min) gewaschen und in 250µl PBS/BSA zur Durchflusszytometrie aufgenommen.

* g = Zentrifugalkraft (Vielfaches der Erdbeschleunigung/Erdbeschleunigungskraft)

4.2.17 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und der Emission von Fluoreszenzsignalen einzeln analysiert werden. Hierzu passieren die in einem Flüssigkeitsstrom einer Mikrokanalküvette fokussierten Zellen nacheinander einen Laserstrahl. Während das Vorwärtstreusignal (Forward Scatter, FSC) proportional zur Größe der Zellen ist, korreliert das Seitwärtstreusignal (Side Scatter, SSC) mit der Granularität und Struktur der Zellen. Auf diese Weise können z.B. die wichtigsten Untergruppen der weißen Blutzellen erfasst werden. Darüber hinaus ermöglicht die Durchflusszytometrie durch die Messung von emittierten Fluoreszenzstrahlen die Analyse einzelner Subpopulationen und deren Aktivitätsgrad. Dafür werden extra- und/oder intrazelluläre Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die an monoklonale Antikörper gekoppelt sind. Der Durchflusszytometer regt die Farbstoffe durch entsprechende Laser an, misst das emittierte Licht verschiedener Wellenlängen mittels spezifischer Detektoren und stellt die Intensitäten pro Zelle in Diagrammen da.

4.2.17.1 Durchflusszytometrische Analyse der transfizierten T1 Zelllinien

Die Transfektionseffizienz der mittels Elektroporation transfizierten T1 Zelllinien (prozentualer Anteil transfizierter Zellen in der Kultur) wurde erstmals nach 3 Tagen durchflusszytometrisch über die Expression von eGFP bzw. mCherry überprüft und im weiteren Verlauf von 31 Tagen an den unsortierten transfizierten Zelllinien kontrolliert. Des Weiteren diente diese Methode zur Verlaufsbeobachtung und Darstellung der stabil transfizierten Zellen pro T1 Zelllinie nach den einzelnen Sortierungsschritten. Pro transfizierte Zelllinie wurden ca. 10000 Zellen mit dem BD FACSCanto II gemessen, über die Geräte-Software FACSDiva in Punkte-Diagrammen dargestellt und anschließend mit der Software FlowJo am Computer genauer ausgewertet. Um

lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurde vor den Messungen DAPI bzw. 7-AAD zu den Proben hinzugegeben. Zur Ermittlung der positiv transfizierten Zellen wurden nur diejenigen Zellen durch das Setzen von so genannten „Gates“ eingeschlossen, die im Durchflusszytometer DAPI bzw. 7-AAD negativ waren und grün (eGFP) bzw. rot (mCherry) fluoreszierten.

4.2.17.2 Sortieren der T1 Zelllinien mittels Durchflusszytometrie

Um die stabil transfizierten Zellen von den untransfizierten bzw. instabil transfizierten Zellen zu trennen, wurden pro transfizierte T1 Zelllinie bis zu 1×10^6 der am stärksten grün (eGFP) bzw. rot (mCherry) fluoreszierenden lebendigen (DAPI- bzw. 7-AAD-negativen) Zellen mit dem BD FACSAria II Cell Sorter über das BCRT Flow Cytometry Lab bzw. die Flow Cytometry Core Facility des Deutschen Rheuma Forschungszentrums Berlin durchflusszytometrisch sortiert.

4.2.17.3 Analyse der PBMC und der durch magnetische Zellsortierung erhaltenen T-Zellen

Nach der Isolation der PBMC von den Psoriasis-Patienten wurde jeweils ein Aliquot mit dem HLA-A2 FITC-Antikörper gefärbt und im BD FACSCalibur durchflusszytometrisch auf HLA-A2 überprüft. Im Anschluss an die durch magnetische Zellsortierung (MACS) erhaltenen HLA-A2+ Spender-T-Zellen wurden Aliquots der Original-PBMC, der Positiv-Fraktion (Isolierte T-Zellen) und Negativ-Fraktion mit CD3-, CD4- und CD8-Antikörper-Fluorchromkonjugaten (Siehe Tabelle 6) gefärbt und durchflusszytometrisch auf deren Reinheit überprüft.

4.2.17.4 Analyse der Aktivierung von CD8+ T-Zellen

Nach den Stimulationsexperimenten und der Färbung der Zellen erfolgte die Messung der hervorgerufenen T-Zell-Aktivierung an den Geräten BD FACSLSR II bzw. BD FACSCanto II. Pro Probe wurden etwa 200.000 Ereignisse im gesetzten „Lymphozyten-Gate“ gemessen. Zur genaueren Auswertung der erhaltenen Punkte-Diagramme wurde anschließend die Software FlowJo benutzt und nach einem festen Gating-Schema (Siehe Ergebnisse) vorgegangen.

4.2.18 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Stimulationsexperimente und Erstellung der Graphen wurde die Software GraphPad Prism verwendet. Als statistisch signifikant wurde ein ermittelter p-Wert von $p < 0,05$ im parameterfreien Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Wilcoxon-Test) gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Klonierung der Expressionsvektoren

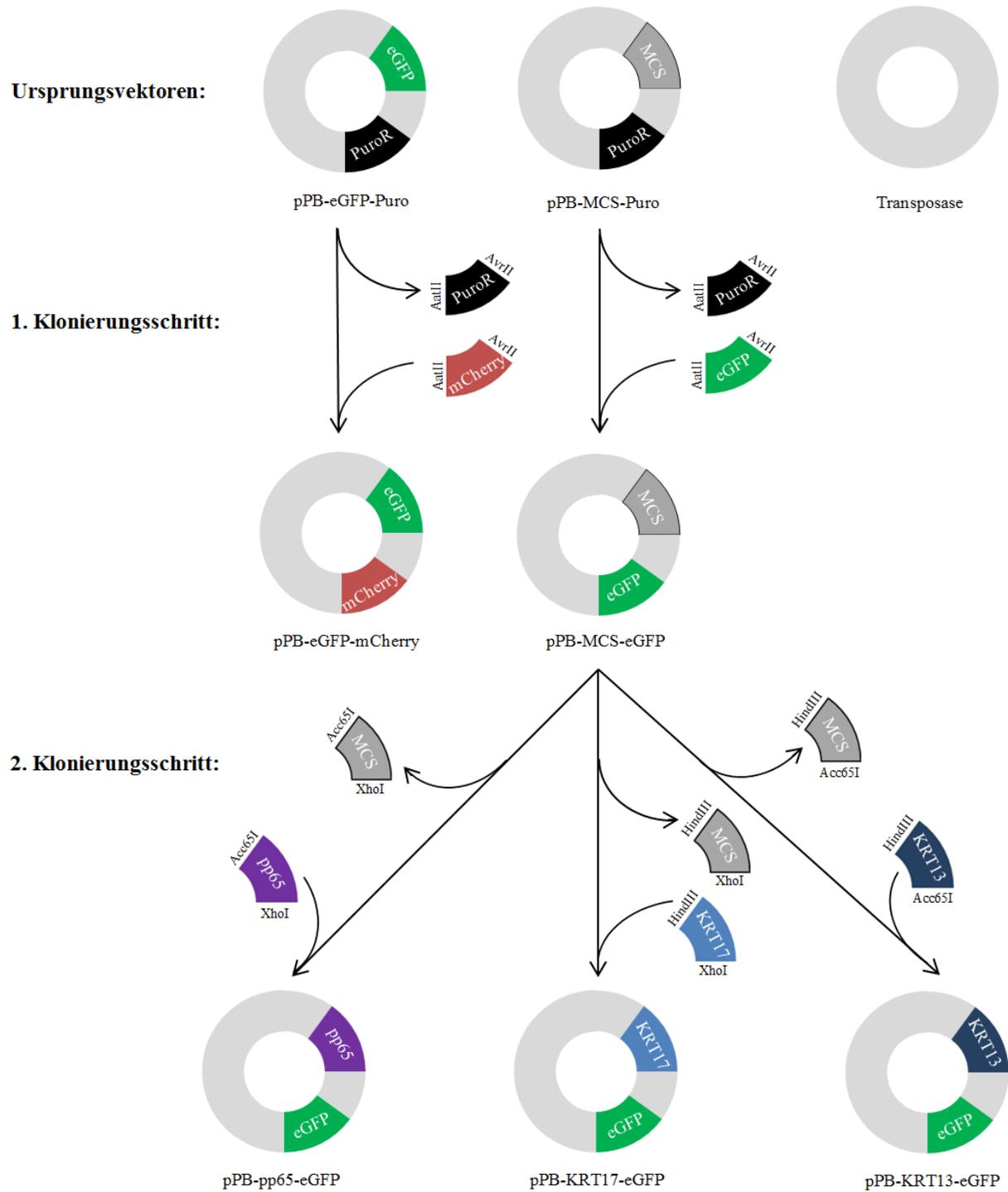


Abbildung 4: Schematische Übersichtsdarstellung der angewendeten Klonierungsstrategie mit den entsprechenden Restriktionsenzymstimmstellen für die einzelnen piggyBac[™]-Expressionsvektoren. PuroR: Puromycin-Resistenz-Gen (Pac-Gen).

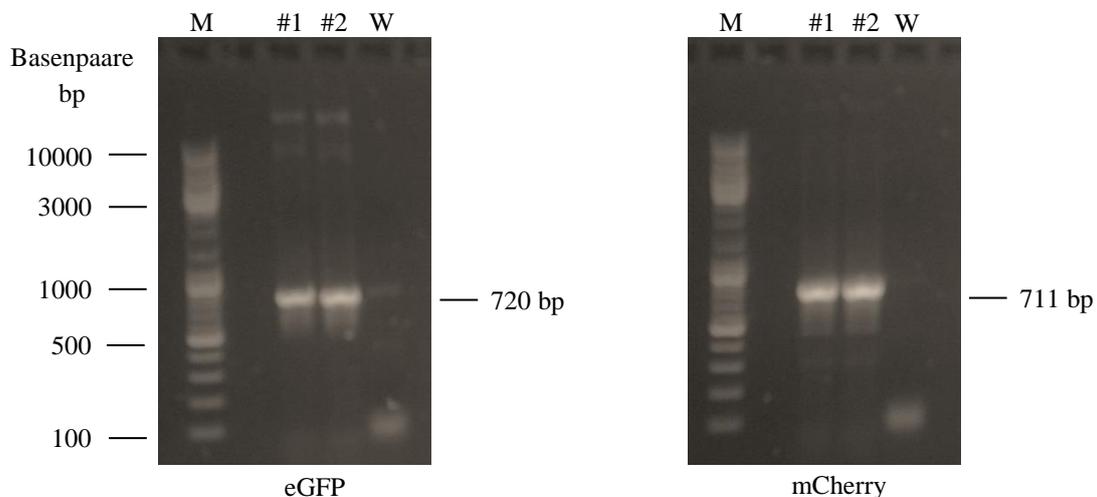
5.1.1 Klonierung der Reporter eGFP und mCherry

Zu Beginn der Experimente wurden meiner Arbeitsgruppe freundlicherweise von Prof. M. Gossen (BCRT) die piggyBacTm-Transposon Expressionsvektoren pPB-MCS-Puro (MCS, engl. Multiple Cloning Site), pPB-eGFP-Puro (Expressionskontrolle) und das Enzym Transposase (mPB) mit den entsprechenden Vektorkarten zur Verfügung gestellt (Siehe Abbildung 4, Ursprungsvektoren). Offensichtlich enthalten beide Expressionsvektoren als Reportergen eine Resistenz gegen das Nukleosid-Antibiotikum Puromycin (PuroR), so dass sich theoretisch stabil-transfizierte Zellen in der Zellkultur durch die Zugabe einer entsprechenden Konzentration von Puromycin selektieren ließen. Im Unterschied zu pPB-MCS-Puro ist bei pPB-eGFP-Puro zur Expressionskontrolle bereits die Nukleotidsequenz von eGFP als zweites Reportergen in die MCS einkloniert. In Vorexperimenten stellte sich jedoch eine überdurchschnittlich hohe natürliche Sensibilität der zu transfizierenden Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) gegenüber Puromycin heraus. So störten bereits sehr niedrige Konzentrationen von Puromycin unerwartet früh die Vermehrung der T1 Zellen und führten häufig zu einem besonders schnellen Absterben (Ergebnisse nicht dargestellt). Zwar konnte letztendlich eine grün-fluoreszierende und gegen Puromycin (0,4µg/ml) resistente T1 Zelllinie T1-eGFP-Puro etabliert werden (Daten nicht gezeigt), jedoch gestaltete sich die Selektion der mit dem piggyBacTm-Expressionsvektor pPB-eGFP-puro stabil-transfizierten T1 Zellen durch die zuvor stattgefundene Elektroporation komplizierter als erwartet. Folglich wurde sich bewusst gegen Puromycin als Reportergen entschieden und als Alternative eGFP bzw. mCherry verwendet. In einem ersten Klonierungsschritt sollte zunächst das Puromycin-Resistenz-Gen (Pac-Gen) in pPB-MCS-Puro durch eGFP und in pPB-eGFP-Puro durch mCherry ersetzt werden (Siehe Abbildung 4).

5.1.1.1 Amplifikation der Nukleotidsequenzen von eGFP und mCherry

Die Amplifikation von eGFP erfolgte aus dem Expressionsvektor pPB-eGFP-Puro. Der Reporter mCherry wurde aus dem bereits in unserem Labor etablierten Vektor PGK-H2B-mCherry (von Dimas Abdirama) amplifiziert. Da die Nukleotidsequenzen von eGFP (720 bp) und mCherry (711 bp) in den ersten 21 und den letzten 25 Basenpaaren identisch sind, konnte für deren Amplifikation dasselbe Primerpaar verwendet werden. Im Hinblick auf die Umklonierung des Puromycin-Resistenzgens wurden die Primer (Tabelle 3) mit entsprechenden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme erweitert. Dabei mussten die Restriktionsenzyme so ausgewählt werden, dass sie die Vektoren pPB-MCS-Puro bzw. pPB-eGFP-Puro nur in der Region des Puromycin-Resistenzgens hinter dem SV40 Promotor schneiden, zugleich aber keine Schnittstellen in den zu

klonierenden Genen eGFP bzw. mCherry haben. Nach Analyse der Plasmidkarte und der Nukleotidsequenzen der Reportergene wurde der Forward-Primer mit der Schnittstelle für das Restriktionsenzym AvrII und der Reverse-Primer mit der Schnittstelle für AatII erweitert. Zur Optimierung der Translation wurde zusätzlich eine Kozak-Sequenz⁸³ (GCCACC) vor das Startkodon im Forward-Primer gesetzt. Mittels dieser Primer und der Pfu-DNA Polymerase (proof-reading-Eigenschaft) wurden eGFP aus pPB-eGFP-puro und mCherry aus PGK-H2B-mCherry bei einer ermittelten Annealingtemperatur von 59°C amplifiziert. Im Anschluss an die PCR wurden die Ansätze in ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die amplifizierten Fragmente nach abgelaufener Gelelektrophorese zunächst unter UV-Licht dargestellt (Abbildung 5). Die amplifizierten DNA-Fragmente von eGFP und mCherry wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin[®] Extract II Set gereinigt. Zur Erzeugung klebriger Enden für die Klonierung der Reporter in die Expressionsvektoren wurden die Fragmente von eGFP und mCherry jeweils mit den Enzymen AvrII und AatII verdaut, anschließend im Agarosegel aufgetragen und nach der Gelelektrophorese erneut aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Als Resultat lagen nun die Inserts von eGFP und mCherry zur Klonierung bereit.



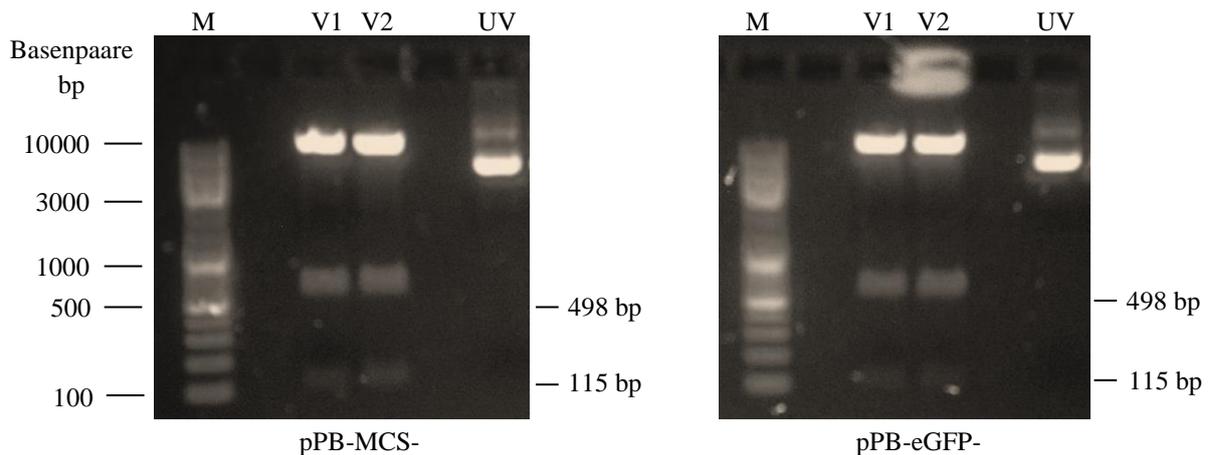
Legende: M: DNA-Marker, #1: Probe 1, #2: Probe 2, W: Wasser (Negativkontrolle)

Abbildung 5: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von eGFP (720 bp) und mCherry (711 bp) in 1% igen Agarosegel unter UV-Licht

5.1.1.2 Restriktionsverdau der Expressionsvektoren zur Klonierung von eGFP und mCherry

Um das Puromycin-Resistenz-Gen (Pac-Gen) der piggyBacTm-Expressionsvektoren pPB-MCS-Puro und pPB-eGFP-Puro durch die Reporter eGFP bzw. mCherry zu ersetzen, wurden beide

Vektoren zunächst mit den Restriktionsenzymen AvrII und AatII verdaut. Nach der Gelelektrophorese der Restriktionsverdauung waren im Agarosegel unter UV-Licht neben der Bande für die aufgeschnittenen und somit linearisierten Vektoren pPB-MCS- bzw. pPB-eGFP- zwei weitere Banden mit den herausgeschnittenen DNA-Fragmenten zu erkennen: eine Bande bei 115 bp und eine weitere Bande bei 498 bp (Abbildung 6). Anschließend wurden die beiden aufgeschnittenen Expressionsvektoren aus dem Agarosegel gelöst und gereinigt.



Legende: M: DNA-Marker, V1: Probe 1, V2: Probe 2, UV: unverdauter Vektor (Negativkontrolle)

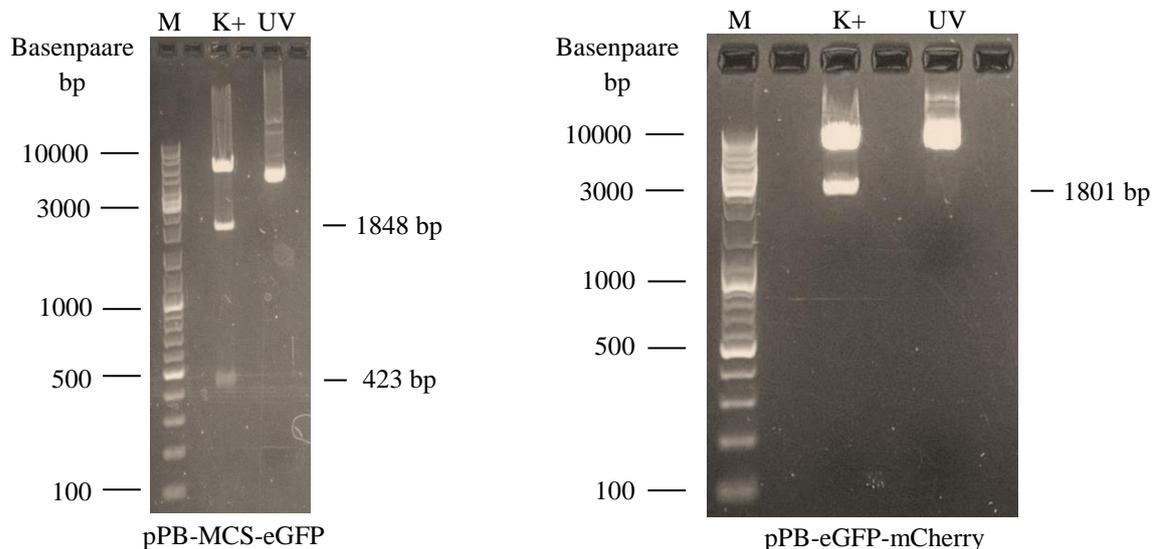
Abbildung 6: Gelelektrophoretische Auftrennung (in 1%igen Agarosegel unter UV-Licht) der Restriktionsverdauung von pPB-MCS-Puro (links) und pPB-eGFP-Puro (rechts) mit AvrII und AatII zur Klonierung von eGFP bzw. mCherry. Die verdauten Expressionsvektoren liegen linearisiert zur Klonierung vor. Bei beiden Vektoren wurden jeweils Fragmente von 498 bp und 115 bp Länge herausgeschnitten.

5.1.1.3 Ligation und Identifikation der Klone pPB-MCS-eGFP und pPB-eGFP-mCherry

Im letzten Arbeitsschritt dieser Klonierung wurden die geschnittenen Vektoren pPB-MCS- bzw. pPB-eGFP- jeweils mit ihren entsprechenden Inserts eGFP bzw. mCherry in einem Ligationsansatz durch das Enzym T4 Ligase ligiert (24h, 17°C). Anschließend erfolgte jeweils die Transformation des gesamten Ligationsansatzes in kompetente *E. coli*. Von einigen gewachsenen Bakterienkolonien auf der Agarplatte wurde die Plasmid-DNA über Minipreps isoliert und diese durch die gelelektrophoretische Auftrennung einzelner Kontroll-Restriktionsverdauung auf potentielle Klone überprüft. Abbildung 7 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der durch Kontroll-Restriktionsverdauung ermittelten positiven Klone von pPB-MCS-eGFP und pPB-eGFP-mCherry in 1%igen Agarosegel unter UV-Licht: Da BsrGI ausschließlich im eGFP-Insert und BamHI den Vektor sogar zweimal schneidet, waren bei einer erfolgreichen Klonierung von pPB-MCS-eGFP neben dem linearisierten Vektor zusätzlich zwei Banden im

Agarosegel erkennbar: eine Bande bei 423 bp und eine weitere Bande bei 1848 bp (Abbildung 7 links). Zur Überprüfung auf mögliche pPB-eGFP-mCherry-Klone wurden die erhaltenen Plasmide ebenfalls mit dem Restriktionsenzym BsrGI verdaut. Da sowohl eGFP als auch mCherry eine Schnittstelle für BsrGI haben, schneidet dieses Restriktionsenzym den Vektor bei einer erfolgreichen Klonierung von pPB-eGFP-mCherry zweimal. Demnach war nach der gelelektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel unter UV-Licht neben dem linearisierten Vektor eine Bande bei 1801 bp erkennbar (Siehe Abbildung 7 rechts). Zum Ausschluss von Mutationen wurden die klonierten Inserts der mittels Kontroll-Restriktionsverdaue erfassten positiven Klone der piggyBacTm-Expressionsvektoren durch die Firma Eurofins MWG Operon sequenziert.

Als Resultat stand nun mit pPB-MCS-eGFP ein piggyBacTm-Expressionsvektor mit einer Multiple Cloning Site (MCS) hinter dem humanen Promotor hEF1 und eGFP als fluoreszierenden Reporter hinter dem SV40-Promotor zur Verfügung (Abbildung 8). Der piggyBacTm-Expressionsvektor pPB-MCS-eGFP sollte die Grundlage für die Klonierung der Antigene pp65, KRT17 und KRT13 darstellen (Siehe Abbildung 4, 2. Klonierungsschritt). Außerdem wurde mit pPB-eGFP-mCherry ein Vektor mit zwei fluoreszierenden Reportern zur Expressionskontrolle etabliert. Dabei befindet sich eGFP hinter dem hEF1-Promotor, mCherry hinter dem SV40-Promotor (Abbildung 9).



Legende: M: DNA-Marker, K+: positiver Klon, UV: unverdauter Vektor (Negativkontrolle)

Abbildung 7: Gelelektrophoretische Auftrennung der Kontroll-Restriktionsverdaue von pPB-MCS-eGFP und pPB-eGFP-mCherry in 1%igen Agarosegel zur Kontrolle der Klonierung. Links: Der Verdau des Klons pPB-MCS-eGFP mit BsrGI und BamH1 zeigt erwartungsgemäß Banden bei 423 bp und 1848 bp im Agarosegel und bestätigt die Klonierung. Rechts: Da durch den Verdau mit BsrGI nur bei erfolgreicher Klonierung von pPB-eGFP-mCherry neben dem linearisierten Vektor eine Bande bei 1801 bp entstehen kann, ist die Klonierung bestätigt.

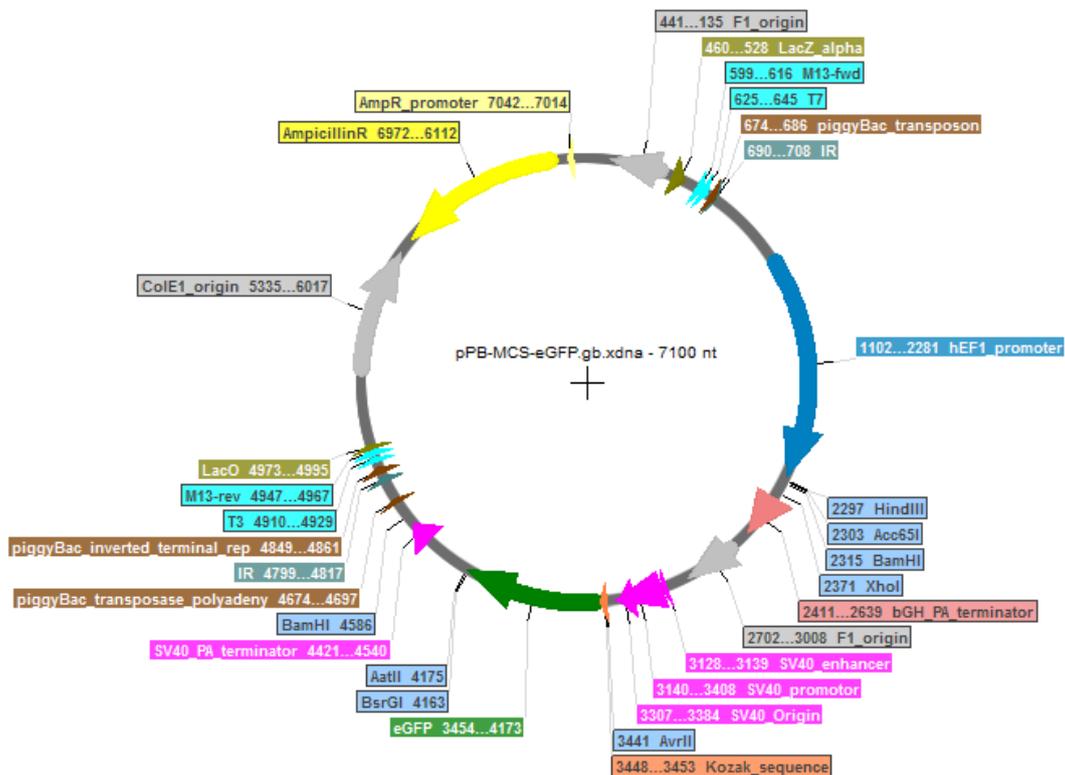


Abbildung 8: Vektorkarte des klonierten piggyBacTm-Expressionsvektors pPB-MCS-eGFP. Dargestellt sind u.a. die für die Klonierung der Antigene verwendeten Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII, Acc65I, XhoI in der Multiple Cloning Site (MCS) und die zum Kontroll-Restriktionsverdau verwendete Restriktionsenzyme BsrGI und BamHI.

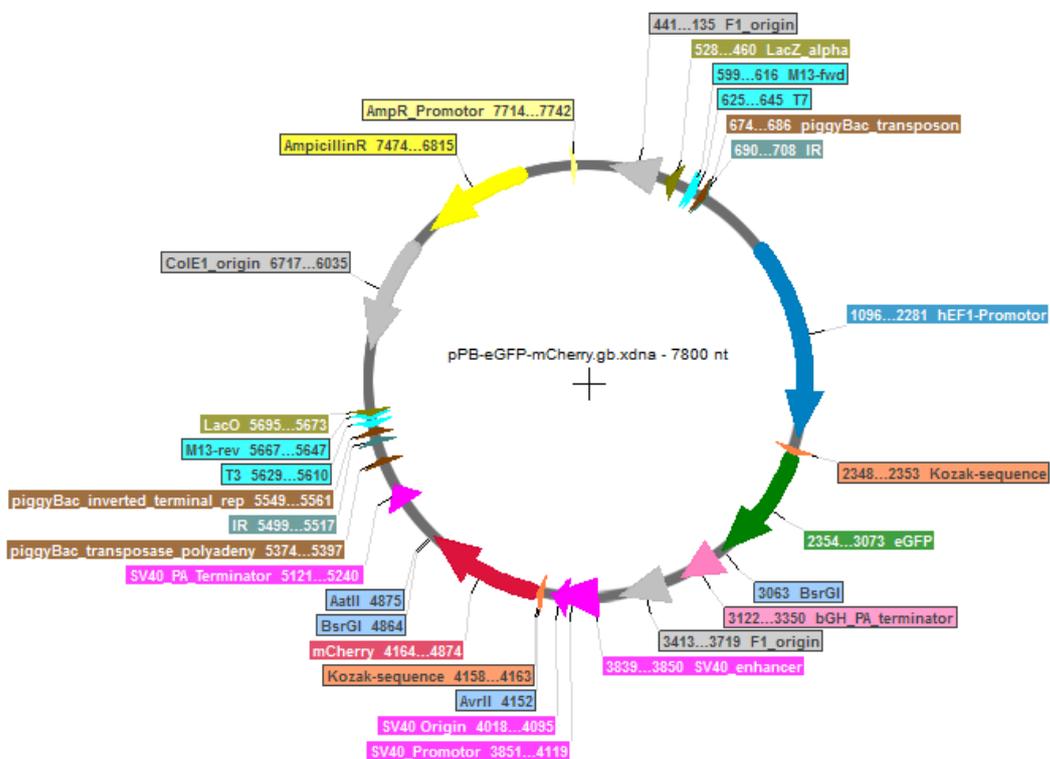
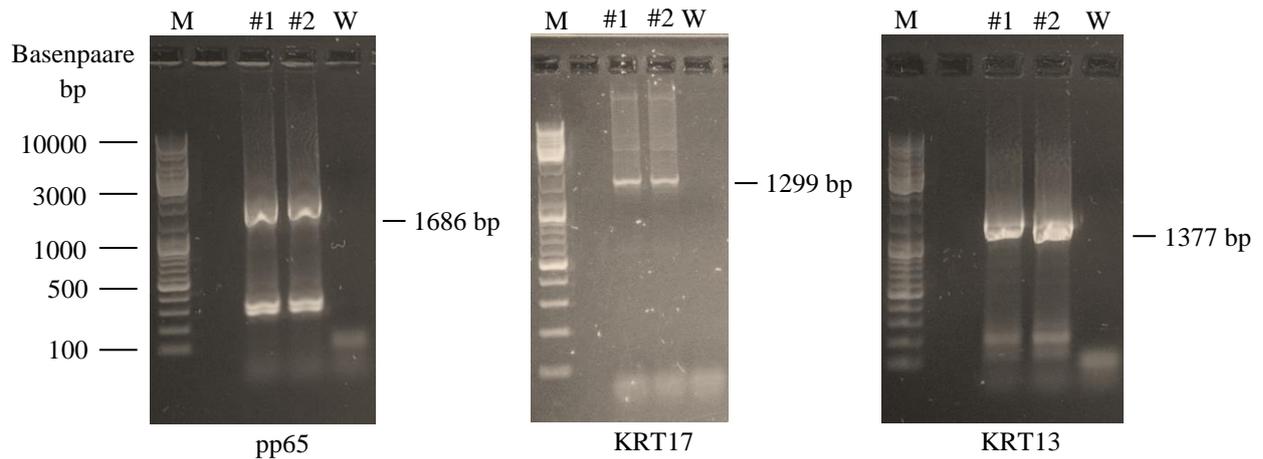


Abbildung 9: Vektorkarte des klonierten piggyBacTm-Expressionsvektors pPB-eGFP-mCherry. Dargestellt sind u.a. die für die Klonierung des mCherry-Inserts verwendeten Schnittstellen der Restriktionsenzyme AatII und AvrII und das zum Kontroll-Restriktionsverdau verwendete Enzym BsrGI.

5.1.2 Klonierung von pp65, KRT17 und KRT13 in pPB-MCS-eGFP

5.1.2.1 Amplifikation der Nukleotidsequenzen von pp65, KRT17 und KRT13

Bei der Amplifikation der Antigene pp65 (1686 bp), KRT17 (1299 bp) und KRT13 (1377 bp) wurde nach dem gleichen Prinzip wie bei der Amplifikation von eGFP bzw. mCherry vorgegangen. Auch hier musste im Hinblick auf die Klonierung der Antigene in den piggyBacTm-Expressionsvektor pPB-MCS-eGFP bei den in die Primer einzufügenden Schnittstellen der Restriktionsenzyme darauf geachtet werden, dass diese nur in der MCS des Vektors und nicht in den zu klonierenden Antigenen vorhanden sind. Daraufhin wurden die Forward-Primer bzw. Reverse-Primer für die Amplifikation von pp65 um die Schnittstellen für Acc65i bzw. XHOI, von KRT17 um HindIII bzw. XHOI und von KRT13 um HindIII bzw. Acc65i erweitert. Zur optimalen Translation wurden die Forward-Primer zusätzlich um eine Kozak-Sequenz⁸³ (GCCACC) erweitert (Siehe Tabelle 3). Alle Antigene wurden bei einer ermittelten Annealing-Temperatur von 59°C durch die Pfu-DNA Polymerase aus den Plasmiden amplifiziert. Im Anschluss an die PCR wurden die Ansätze in ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die amplifizierten Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung zunächst unter UV-Licht dargestellt (Abbildung 10). Die amplifizierten DNA-Fragmente von pp65, KRT17 und KRT13 wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin[®] Extract II Set gereinigt. Zur Erzeugung klebriger Enden für die Klonierung wurden die überhängenden Enden der gereinigten PCR-Produkte von pp65, KRT17 und KRT13 mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut: pp65 mit Acc65i und XHOI, KRT17 mit HindIII und XHOI und KRT13 mit HindIII und Acc65i. Danach wurden die geschnittenen Antigen-Inserts im Agarosegel aufgetragen und nach abgelaufener Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Als Resultat lagen nun die Inserts der Antigene pp65, KRT17 und KRT13 zur jeweiligen Klonierung in den piggyBacTm-Expressionsvektor pPB-MCS-eGFP bereit.

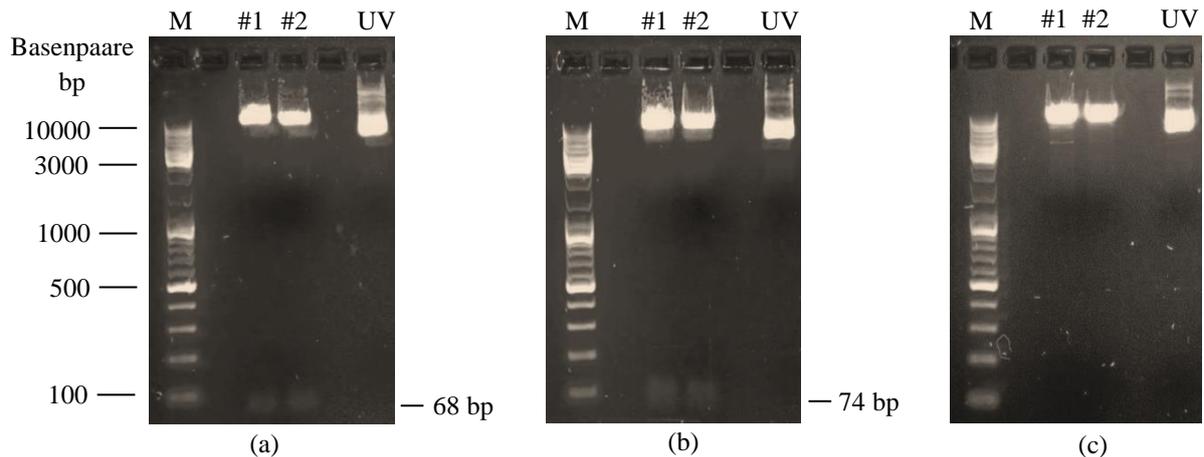


Legende: M: DNA-Marker #1: Probe 1 #2: Probe 2 W: Wasser (Negativkontrolle)

Abbildung 10: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von pp65 (1686 bp), KRT17 (1299 bp) und KRT13 (1377 bp) in 1%igen Agarosegel unter UV-Licht.

5.1.2.2 Restriktionsverdau von pPB-MCS-eGFP zur Klonierung von pp65, KRT17 und KRT13

Um die Inserts der Antigene pp65, KRT17 und KRT13 jeweils in die MCS des piggyBacTm-Expressionsvektors pPB-MCS-eGFP zu klonieren, wurde der Vektor mit denselben Restriktionsenzymen verdaut, wie die überhängenden Enden der Antigen-Inserts. Folglich wurde pPB-MCS-eGFP in der MCS (a) zur Klonierung des pp65-Inserts mit Acc65i und XHOI (68 bp), (b) zur Klonierung des KRT17-Inserts mit HindIII und XHOI (74 bp) und (c) zur Klonierung von KRT13 mit HindIII und Acc65i (14 bp) verdaut (Siehe Abbildung 11). Die DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Gelelektrophorese in 1%igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht dargestellt (Abbildung 11): Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsverdau, waren im Agarosegel neben den Banden der linearisierten Vektoren vor allem die erwarteten Banden für (a) bei 68 bp und (b) 74 bp erkennbar (Siehe Abbildung 11). Die bei (c) herausgeschnittenen 14 bp kamen im Agarosegel aufgrund ihrer zu geringen Größe nicht zur Darstellung.



Legende: M: DNA-Marker, V1: Vektor Probe 1, V2: Vektor Probe 2, UV: unverdauter Vektor (Negativkontrolle)

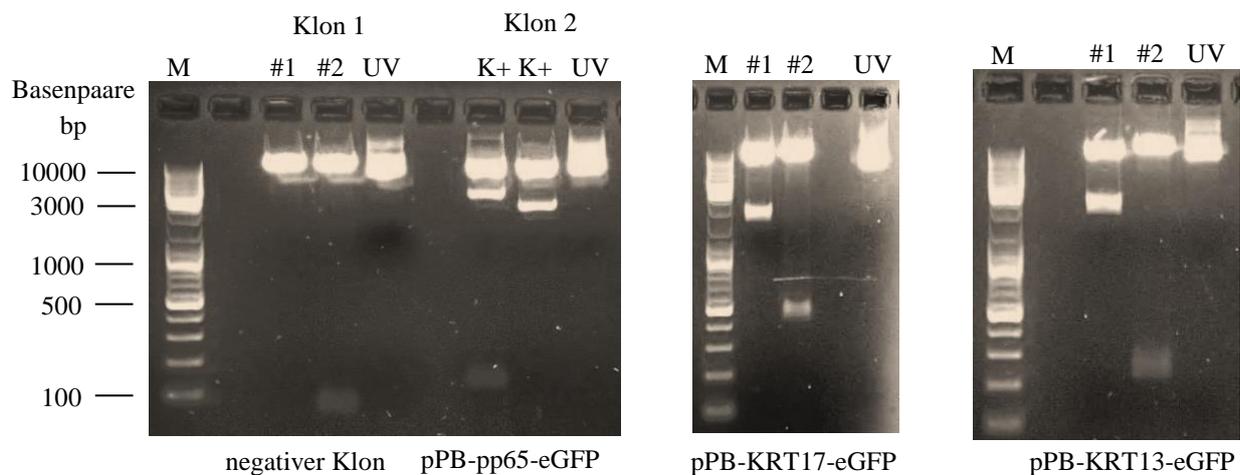
Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung der entsprechenden Restriktionsverdaue von pPB-MCS-eGFP zur Klonierung der Inserts (a) pp65, (b) KRT17 und (c) KRT13 in 1%igen Agarosegel unter UV-Licht. Zur Klonierung des pp65-Inserts wurde pPB-MCS-eGFP in der Multiple Cloning Site (MCS) mit Acc65i und XHOI verdaut, wodurch erwartungsgemäß Fragmente von 68 bp Länge aus dem Vektor herausgeschnitten wurden. Zur Klonierung des KRT17-Inserts wurde pPB-MCS-eGFP in der MCS mit HindIII und XHOI verdaut, wodurch erwartungsgemäß Fragmente von 74 bp Länge entstanden. Für die Klonierung des KRT13-Inserts wurde pPB-MCS-eGFP mit HindIII und Acc65i verdaut, so dass 14 bp aus der MCS herausgeschnitten wurden. Aufgrund ihrer geringen Größe ist diese Bande nicht im Agarosegel zu sehen. Der linearisierte vorliegende Vektor im Vergleich zum unverdauten Vektor liefert allerdings den Beweis dafür, dass zweimal geschnitten wurde.

5.1.2.3 Ligation und Identifikation der Klone pPB-pp65-eGFP, pPB-KRT17-eGFP und pPB-KRT13-eGFP

Im letzten Arbeitsschritt dieser Klonierung wurden die entsprechend geschnittenen Vektoren pPB-MCS-eGFP jeweils mit ihren Antigen-Inserts pp65, KRT17 bzw. KRT13 durch das Enzym T4 Ligase ligiert (24h, 17°C). Danach erfolgte die Transformation der Ligationsansätze in kompetente *E. coli*. Von einigen angewachsenen Bakterienkolonien auf der Agarplatte wurde die Plasmid-DANN durch Minipreps isoliert und anschließend über die gelelektrophoretische Auftrennung der Kontroll-Restriktionsverdaue auf potentielle Klone überprüft. Dazu wurden die potentiellen Klone jeweils mit zwei Kombinationen von Restriktionsenzymen verdaut (Abbildung 12): Während zur Kontrolle der pPB-pp65-eGFP-Klone durch das Restriktionsenzym BgIII (Variante 1) neben dem linearisierten Vektor vor allem Banden bei 117 bp und 2174 bp zu erwarten waren, wurde mittels Acc65i und XHOI (Variante 2) das klonierte pp65-Insert (1686 bp) wieder herausgeschnitten (Abbildung 12, links). Durch die Enzyme HindIII und XHOI (Variante 1) wurde bei einem pPB-KRT17-eGFP-Klon das KRT17-Insert (1312 bp) wieder herausgeschnitten (Abbildung 12, mitte). Eine Bande bei 423 bp durch den

Verdau von pPB-KRT17-eGFP mit BamHI und BsrGI (Variante 2) konnte zudem beweisen, dass durch die Klonierung von KRT17 die Schnittstelle für BamHI in der MCS wegfällt. Im Kontroll-Restriktionsverdau für pPB-KRT13-eGFP-Klone wurde das KRT13-Insert (1390 bp) mit HindIII und Acc65i (Variante 1) herausgeschnitten und somit die erfolgreiche Klonierung bewiesen (Abbildung 12, rechts). Zudem lieferte der Verdau mit XHOI (Variante 2) durch eine Bande bei 221 bp einen weiteren Beweis für die erfolgreiche Klonierung von KRT13. Zum Ausschluss von Mutationen wurden die klonierten Antigen-Inserts beider Expressionsvektoren bei der Firma Eurofins MWG Operon sequenziert.

Als Resultat standen nun neben dem Antigen-leeren piggyBacTm-Expressionsvektor pPB-MCS-eGFP und pPB-eGFP-mCherry zur Expressionskontrolle (Siehe oben) auch die Antigen- bzw. potentielle Psoriasis-Autoantigene tragenden piggyBacTm-Expressionsvektoren pPB-pp65-eGFP (Abbildung 13), pPB-KRT17-eGFP (Abbildung 14) und pPB-KRT13-eGFP (Abbildung 15) zur Transfektion in 174xCEM.T1 (T1) zur Verfügung (Siehe auch schematische Übersichtsdarstellung Abbildung 4).



Legende: M: DNA-Marker, #1: Kontroll-Restriktionsverdau Variante 1, #2: Kontroll-Restriktionsverdau Variante 2
UV: unverdauter Vektor (Negativkontrolle)

Abbildung 12: Gelelektrophoretische Auftrennung der Kontroll-Restriktionsverdaue von pPB-pp65-eGFP, pPB-KRT17-eGFP und pPB-KRT13-eGFP in 1%igen Agarosegel unter UV-Licht. Im Unterschied zu Klon 1 zeigt Klon 2 nach Verdau mit BgIII (#1) bzw. HindIII und Acc65i (#2) erwartungsgemäß Banden bei 2174 bp und 117 bp bzw. 1686 bp (links). Klon 2 stellt somit pPB-pp65-eGFP dar, bei Klon 1 ist die Klonierung fehlgeschlagen. Beim pPB-KRT17-eGFP-Klon (mitte) wird KRT17 (1312 bp) durch HindIII und XHOI herausgeschnitten (#1). Zudem fällt durch die erfolgreiche Klonierung von KRT17 die zweite Schnittstelle von BamHI weg, wie durch die Bande bei 412 bp nach dem Verdau mit BamHI und BsrGI (#2) zu erkennen ist. Bei dem pPB-KRT13-Klon (rechts) schneiden die Enzyme HindIII und Acc65I das KRT13-Insert heraus (#1). In #2 liefert der Verdau mit XHOI erwartungsgemäß eine Bande bei 221 bp durch die erfolgreiche Klonierung.

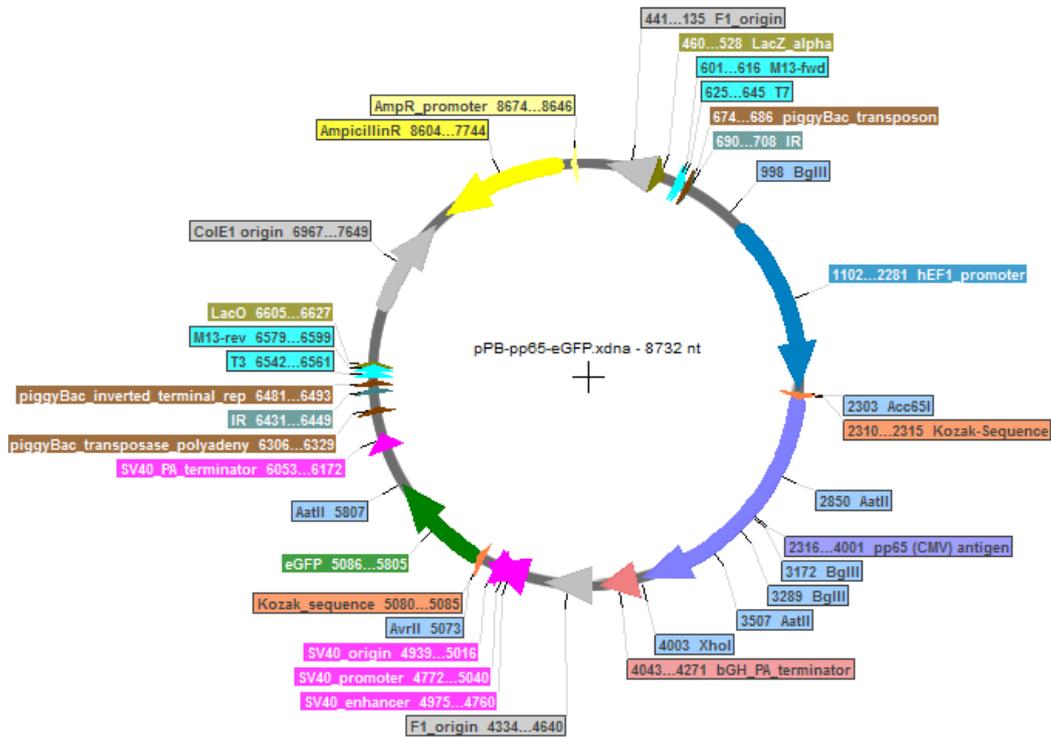


Abbildung 13: Vektorkarte des klonierten piggyBac™-Expressionsvektors pPB-pp65-eGFP. Dargestellt sind u.a. die für die Klonierung von pp65 verwendeten Schnittstellen der Restriktionsenzyme Acc65i und XhoI sowie das zum Kontroll-Restriktionsverdau verwendete Restriktionsenzym BgIII.

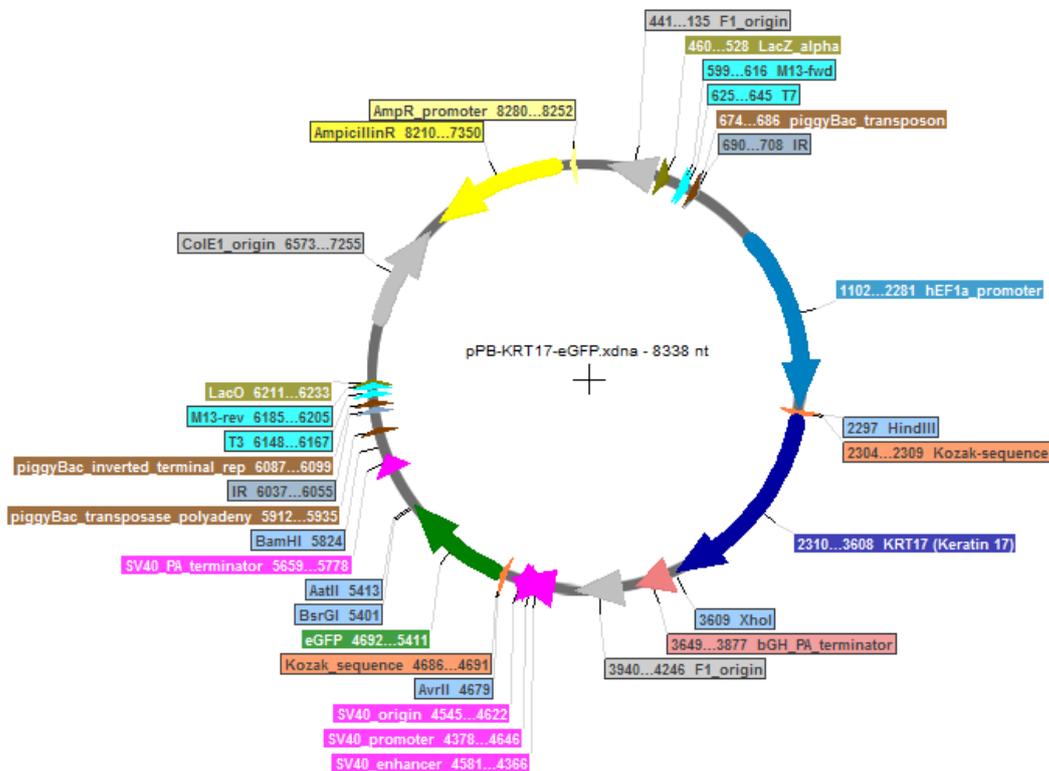


Abbildung 14: Vektorkarte des klonierten piggyBac™-Expressionsvektors pPB-KRT17-eGFP. Dargestellt sind u.a. die für die Klonierung von Keratin 17 (KRT17) verwendeten Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII/XhoI und die zum Kontroll-Restriktionsverdau verwendeten Restriktionsenzyme BsrGI und BamHI.

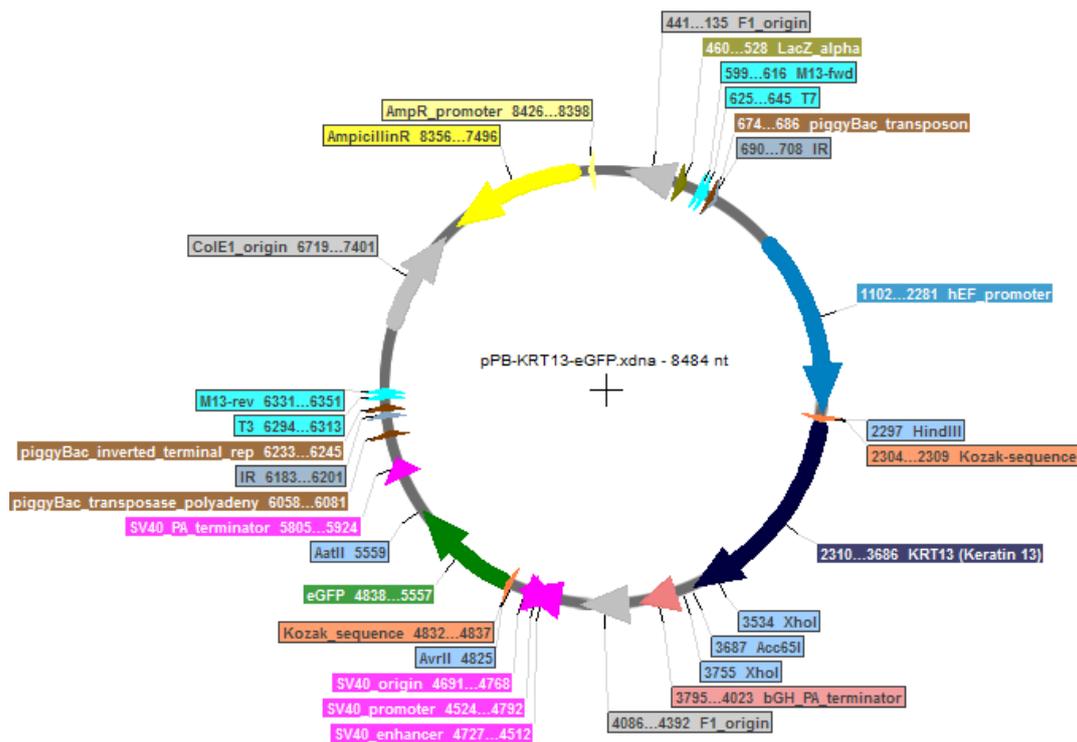
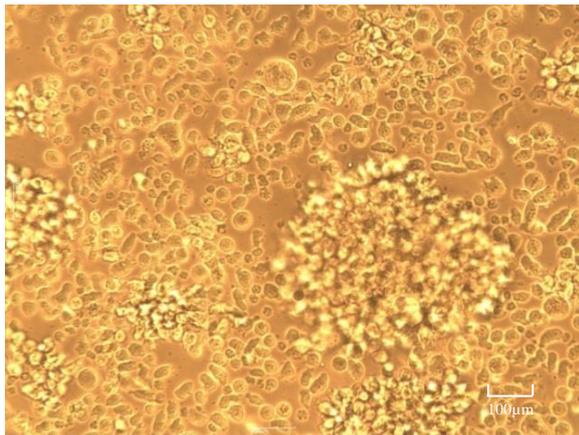


Abbildung 15: Vektorkarte des klonierten piggyBacTm-Expressionsvektors pPB-KRT13-eGFP. Dargestellt sind u.a. die für die Klonierung von Keratin 13 (KRT13) verwendeten Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII/Acc65i und das zum Kontroll-Restriktionsverdau verwendete Restriktionsenzym XHOI.

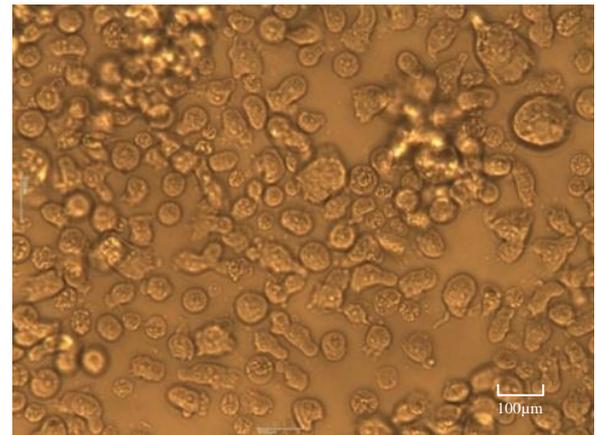
5.2 Etablierung der Zelllinien

5.2.1 Die Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) im Lichtmikroskop und Durchflusszytometer

Abbildung 16 zeigt die Suspensionszelllinie 174xCEM.T1 (T1) im Lichtmikroskop in 20- (links) und 40-facher (rechts) Vergrößerung. Bei der Transfektion von T1 mit den klonierten piggyBacTm-Transposon-Expressionsvektorsystem wurde neben mCherry vor allem eGFP als Reporter-Gen zur Ermittlung der Transfektionseffizienz und Sortierung der stabil-transfizierten T1 Zellen verwendet. Folglich musste in Vorversuchen durchflusszytometrisch zunächst sichergestellt werden, dass T1 nicht grün bzw. rot autofluoresziert. Im Durchflusszytometer (BD FACSCanto II) zeigt sich die Zelllinie T1 negativ für GFP, d.h. die lebenden Zellen fluoreszieren in blauem Licht nicht grün (Abbildung 17). Die Messung von T1 im BD FACSAria II konnte zudem bestätigen, dass T1 keine rote Autofluoreszenz aufweist und demzufolge pPB-eGFP-mCherry zur Expressionskontrolle des piggyBacTm-Transposon-Expressionsvektorsystems in T1 verwendet werden kann (Punktediagramm nicht gezeigt).



20x



40x

Abbildung 16: Die Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) im Lichtmikroskop in 20-facher und 40-facher Vergrößerung

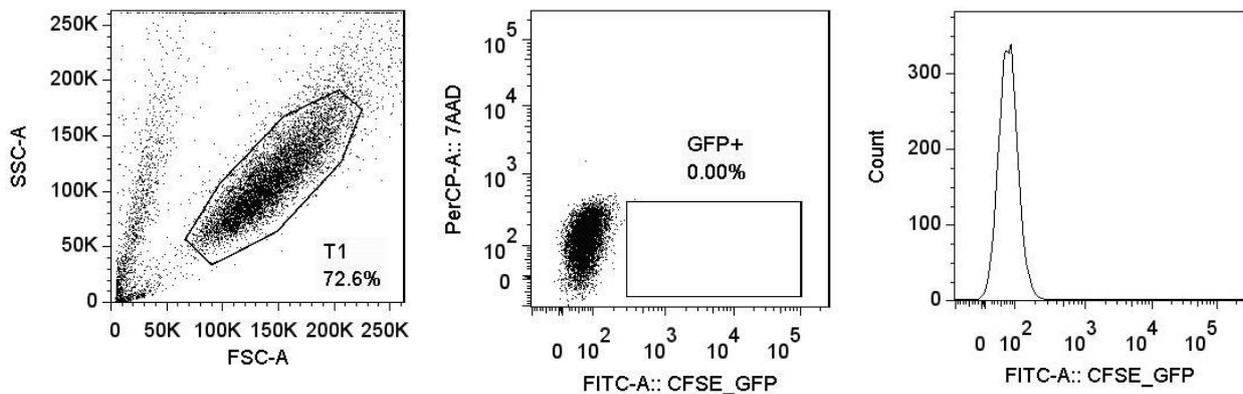


Abbildung 17: Die Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) im Durchflusszytometer BD FACSCanto II
T1 ist eGFP-negativ und fluoresziert demzufolge nicht grün.

5.2.2 Transfektion der T1 Zelllinien und Transfektionseffizienz

Nach den einzelnen Transfektionen von 174xCEM.T1 (T1) mit den klonierten piggyBacTm-Expressionsvektoren und dem Enzym Transposase wurden die fünf elektroporierten Zelllinien folgendermaßen bezeichnet: T1-eGFP-mCherry, T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP. Das Enzym Transposase sollte dabei durch spezifisches Schneiden an den Transposons der piggyBacTm-Expressionsvektoren für die stabile Transfektion der klonierten Antigene bzw. Reporter sorgen. Zur Ermittlung des prozentualen Anteils transfizierter T1 Zellen (Transfektionseffizienz) wurden die elektroporierten T1 Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP nach drei Tagen Zellkultur erstmals mit dem BD FACSCantoII auf ihren Anteil von eGFP-positiven Zellen (grün-fluoreszierenden

Zellen) unter den lebenden Zellen untersucht. Abbildung 18 zeigt das zur Auswertung benutzte Gating-Schema. Zur Ermittlung des Anteils der stabil-transfizierten Zellen unter den lebenden Zellen wurde dieselbe Untersuchung an den nicht sortierten T1 Zelllinien über einen Zeitraum von insgesamt 31 Tagen durchgeführt (Abbildung 19). Am dritten Tag nach der Elektroporation lebte ungefähr noch ein Viertel der T1 Zellen (T1-MCS-eGFP: 27,3%, T1-pp65-eGFP: 21,6%, T1-KRT17-eGFP: 23,9% und T1-KRT13-eGFP: 17,7%). Dabei variierte der Anteil der grün fluoreszierenden Zellen unter den lebenden Zellen zwischen 5% (T1-pp65-eGFP) und 27% (T1-KRT17-eGFP). Im Verlauf der folgenden sieben Tage in der Zellkultur stieg bei fast allen Zelllinien der Anteil der lebenden Zellen auf bis zu 74% an und blieb bis zum Ende der Untersuchung nahezu unverändert. Allerdings lag jeweils der Anteil der eGFP-positiven unter den lebenden Zellen bereits am 10. Tag nach der Elektroporation nur noch zwischen 0,114% (T1-pp65-eGFP) und 1,15% (T1-KRT13-eGFP) und blieb bis zum 31. Tag nahezu unverändert.

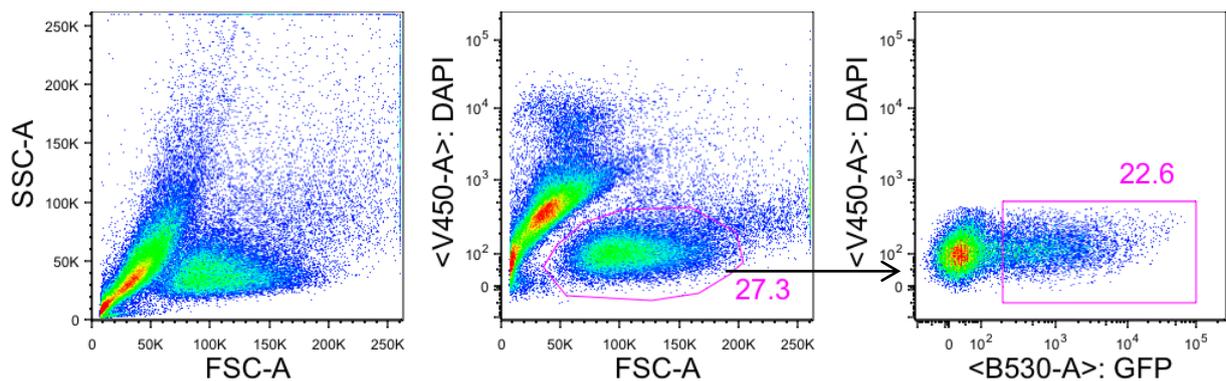
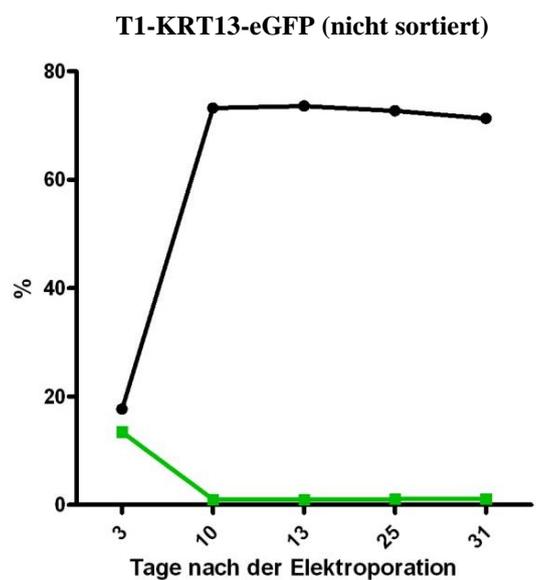
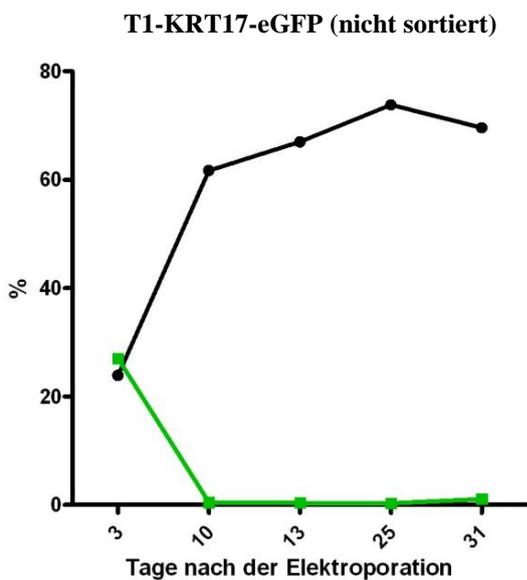
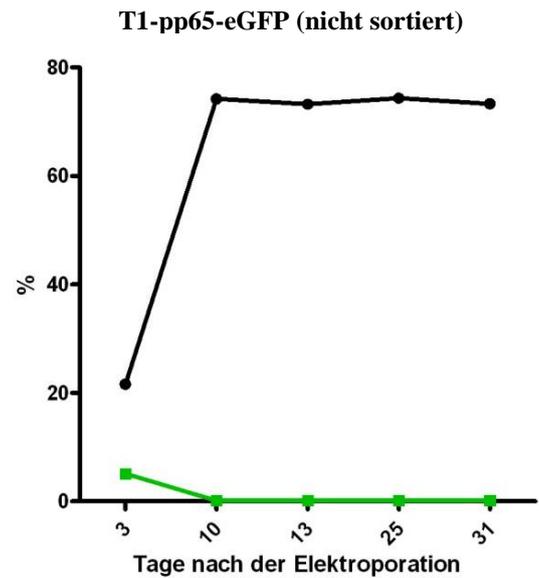
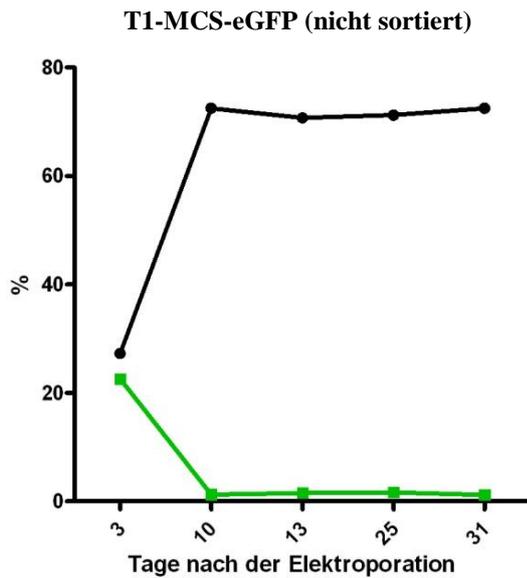


Abbildung 18: Gating-Schema zur Untersuchung der Transfektionseffizienz bzw. des Anteils grün fluoreszierender Zellen unter den lebenden Zellen für die transfizierten Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP. Dargestellt ist die Zelllinie T1-MCS-eGFP im BD FACSCanto II am 3. Tag nach der Elektroporation.



Legende:

- lebende Zellen
- eGFP+ von den lebenden Zellen

Abbildung 19: Untersuchung der Transfektionseffizienz (stabile Transfektion) anhand der Expression von eGFP. Dazu wurden die mit dem piggyBacTM-Transposon-Expressionsvektorsystem durch Amaxa-Nucleofector-Elektroporation transfizierten T1 Zelllinien über einen Zeitraum von 31 Tagen durchflusszytometrisch gemessen (BD FACSCanto II).

5.2.3 Sortierung der transfizierten T1 Zelllinien

Um den Anteil der stabil-transfizierten Zellen in den etablierten T1 Zelllinien zu erhöhen, wurden jeweils die am stärksten grün fluoreszierenden lebenden Zellen (GFP+) von T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-eGFP-KRT13 bzw. die am stärksten gleichzeitig grün und rot fluoreszierenden lebenden Zellen (GFP+/mCherry+) von T1-eGFP-mCherry (Expressionskontrolle) mit dem FACS AriaII Cell Sorter sortiert und danach neu kultiviert. Insgesamt wurden die transfizierten T1 Zelllinien nach der Elektroporation jeweils viermal sortiert: Am Tag 11 nach der Elektroporation erfolgte die erste Zellsortierung. Nach sechs Tagen Kultivierung der sortierten Zellen erfolgten der zweite und wiederum 13 Tage später der dritte Sortierungsschritt. Am siebten Tag nach dem dritten Sortierungsschritt lag der Anteil der eGFP+ lebenden Zellen bei den entsprechenden T1 Zelllinien bereits zwischen 83% und 96%. Durch einen vierten und letzten Zellsortierungsschritt konnte der Anteil der eGFP+ bzw. eGFP und mCherry doppelpositiven Zellen bei allen T1 Zelllinien auf bis zu 99% gesteigert werden. Im Unterschied zum BD FACSCantoII und BD FACSLSR II konnten durch den BD FACS AriaII Cell Sorter auch die für eGFP und mCherry doppelpositiven Zellen der Zelllinie T1-eGFP-mCherry dargestellt und entsprechend sortiert werden (Abbildung 20). Abbildung 21 zeigt die eGFP+ T1 Zellen unter den lebenden T1 Zellen (7AAD-negativ) der stabil-transfizierten T1 Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP im BD FACSLSR II, sieben Tage nach dem letzten Sortierungsschritt.

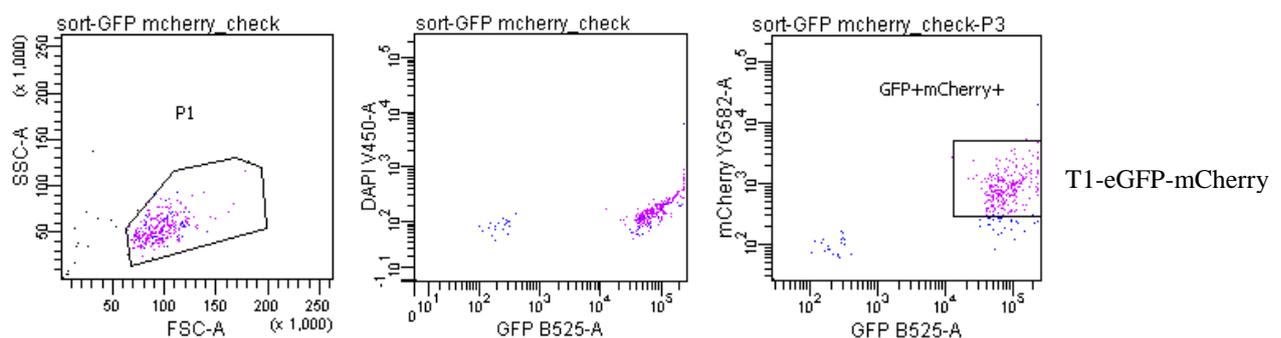


Abbildung 20: Darstellung der für eGFP und mCherry doppelpositiven Zellen der Zelllinie T1-eGFP-mCherry im BD FACS AriaII Cell Sorter (3. Sortierungsschritt). Die am stärksten für eGFP und mCherry positiven Zellen (rechts: Gate GFP+mCherry+) wurden anschließend ein viertes Mal sortiert und kultiviert.

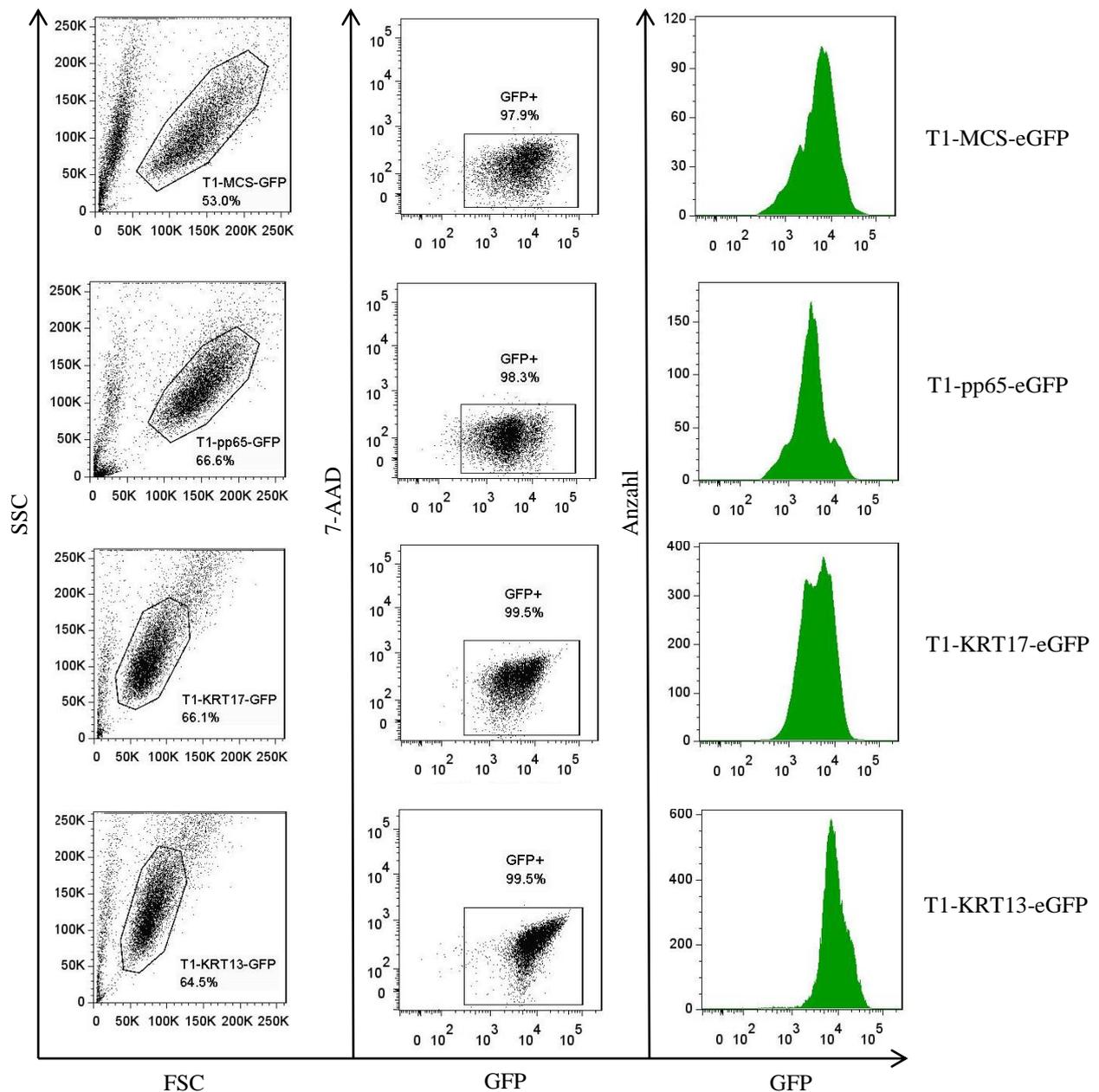


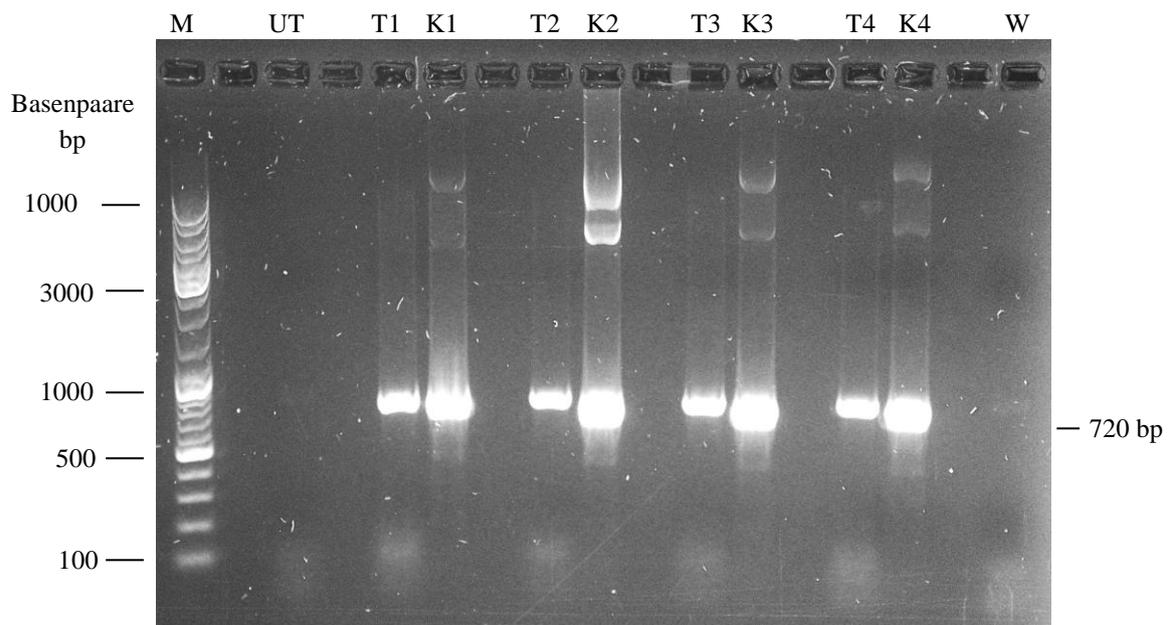
Abbildung 21: Darstellung der stabil-transfizierten Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP im Durchflusszytometer BD FACSLSR II 7 Tage nach der 4. durchflusszytometrischen Zellsortierung über GFP. Der Anteil der GFP-positiven Zellen unter den lebenden Zellen (7-AAD negativ) der einzelnen T1 Zelllinien liegt bei nahezu 100%.

5.2.4 Nachweis der Antigene und Reporter im Genom der etablierten T1 Zelllinien

5.2.4.1 Nachweis von eGFP im Genom der T1 Zelllinien

Zum Nachweis des klonierten Reporters eGFP im Genom der etablierten T1 Zelllinien wurde zunächst deren DNA isoliert. Im Anschluss erfolgte eine PCR mit den bereits für die

Amplifikation aus den Plasmiden bekannten Primern. Abbildung 22 zeigt das Gelelektrophorese-Bild nach der Amplifikation von eGFP aus den Genomen der etablierten Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP mit entsprechenden Positiv- bzw. Negativkontrollen. Offenbar konnte aus den Genomen aller genannten T1 Zelllinien eGFP amplifiziert werden. Im Genom der untransfizierten Zelllinie T1 konnte kein eGFP nachgewiesen werden. Die Amplifikation von eGFP aus den entsprechenden piggyBacTm-Expressionsvektoren diente als Positivkontrolle, Wasser als Negativkontrolle.



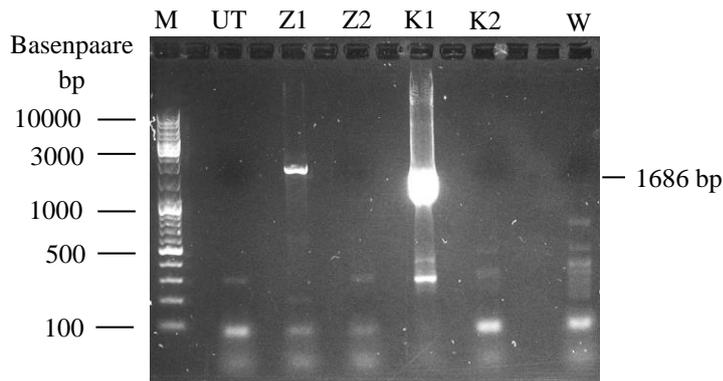
Legende: M: DNA-Marker, UT: untransfizierte Zelllinie T1, T1: T1-MCS-eGFP, K1: pPB-MCS-eGFP (Positivkontrolle), T2: T1-pp65-eGFP, K2: pPB-pp65-eGFP (Positivkontrolle), T3: T1-KRT17-eGFP, K3: pPB-KRT17-eGFP (Positivkontrolle), T4: T1-KRT13-eGFP, K4: pPB-KRT13-eGFP (Positivkontrolle), W: Wasser (Negativkontrolle)

Abbildung 22: Gelelektrophorese der PCR-Produkte von eGFP (720 bp) aus dem Genom der etablierten T1 Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP in 1%igen Agarosegel unter UV-Licht.

5.2.4.2 Nachweis von pp65, KRT17 bzw. KRT13 im Genom der T1 Zelllinien

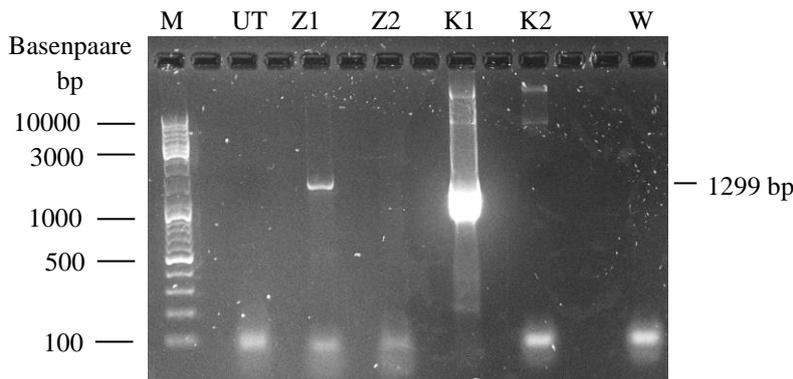
Zur Amplifikation der klonierten Antigene pp65, KRT17 und KRT13 aus dem Genom der etablierten T1 Zelllinien wurden die für die Amplifikation der Antigene aus den Plasmiden bekannten Primer (Tabelle 3) verwendet. Abbildung 23 zeigt die Gelelektrophorese-Bilder nach der Amplifikation von pp65 (1686 bp) aus T1-pp65-eGFP, von KRT17 (1299 bp) aus T1-KRT17-eGFP und von KRT13 (1377 bp) aus T1-KRT13-eGFP. Als Positivkontrolle diente

jeweils die Amplifikation der Antigene aus den entsprechenden piggyBacTm-Expressionsvektoren, Wasser stellte die Negativkontrolle dar. Offenbar ließen sich aus den Genomen der etablierten T1 Zelllinien jeweils die klonierten Antigene amplifizieren. Aus dem Genom der untransfizierten Zelllinie T1 konnte weder pp65 noch KRT17 oder KRT13 mit den entsprechenden Primerpaaren amplifiziert werden. Auch in der Zelllinie T1-MCS-eGFP war mittels PCR erwartungsgemäß keines der genannten Antigene im Genom nachweisbar.



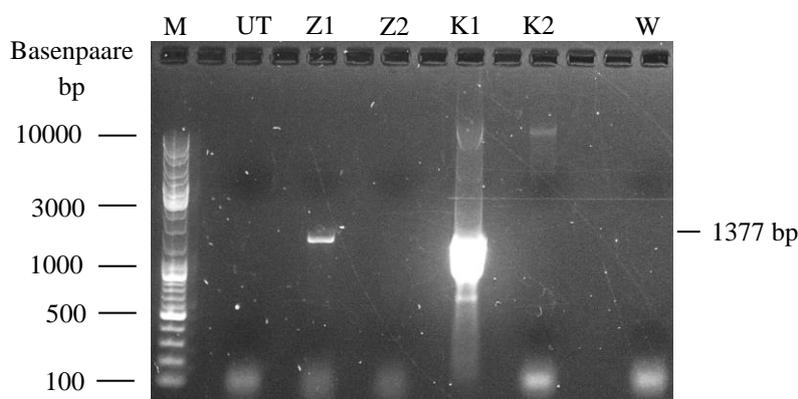
Legende:

M: DNA-Marker
 UT: untransfizierte Zelllinie T1
 Z1: T1-pp65-eGFP
 Z2: T1-MCS-eGFP
 K1:pPB-pp65-eGFP
 (Positivkontrolle)
 K2:pPB-MCS-eGFP
 (Negativkontrolle)
 W:Wasser (Negativkontrolle)



Legende:

M: DNA-Marker
 UT: untransfizierte Zelllinie T1
 Z1: T1-KRT17-eGFP
 Z2: T1-MCS-eGFP
 K1:pPB-KRT17-eGFP
 (Positivkontrolle)
 K2:pPB-MCS-eGFP
 (Negativkontrolle)
 W:Wasser (Negativkontrolle)



Legende:

M: DNA-Marker
 UT: untransfizierte Zelllinie T1
 Z1: T1-KRT13-eGFP
 Z2: T1-MCS-eGFP
 K1:pPB-KRT13-eGFP
 (Positivkontrolle)
 K2:pPB-MCS-eGFP
 (Negativkontrolle)
 W:Wasser (Negativkontrolle)

Abbildung 23: Gelelektrophorese der PCR-Produkte von pp65 (Bild oben, 1686 bp), KRT17 (Bild mitte, 1299 bp) und KRT13 (Bild unten, 1377 bp) aus dem Genom der etablierten Zelllinien T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP in 1%igen Agarosegel unter UV-Licht.

5.2.5 Oberflächenmoleküle der etablierten T1 Zelllinien

Laut ATTC[®] exprimiert die Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) neben HLA-Aw30, -B5, -Bw4, -Bw6 und CD7 vor allem HLA-A2, aber auch HLA-DR7 auf ihrer Oberfläche. Da insbesondere die Expression von HLA-A2 zur Untersuchung der Reaktion von CD8+ T-Zellen in den folgenden Experimenten von entscheidender Bedeutung war, wurden die Zelllinien T1, T1-MCS-eGFP und T1-pp65-eGFP mit einem an das Fluorochrom FITC gekoppelten HLA-A2 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch (BD FACSCanto II) gemessen. Bei dieser Gelegenheit wurden die Zelllinien auch auf die Expression der Oberflächenmoleküle bzw. co-stimulatorischen Rezeptoren CD3, CD19, CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR durchflusszytometrisch untersucht. Die Untersuchung ergab, dass die untransfizierte Zelllinie T1 und die mit den piggyBacTm-Expressionsvektoren transfizierten Zelllinien T1-MCS-eGFP und T1-pp65-eGFP erwartungsgemäß große Mengen von HLA-A2 und HLA-DR auf ihrer Oberfläche aufzeigen. Dabei ist die Expression von HLA-A2 und HLA-DR bei allen drei Zelllinien identisch. Zusätzlich sind alle drei Zelllinien positiv für CD19, CD40, CD69, CD80, CD83 und CD86, allerdings negativ für CD3 (Tabelle 10).

Tabelle 10: Untersuchung ausgewählter Oberflächenmoleküle der Zelllinien T1, T1-MCS-eGFP und T1-pp65-eGFP

Zelllinie	CD3	CD19	CD40	CD80	CD83	CD86	HLA-A2	HLA-DR
T1	-	+	+	+	+	+	+	+
T1-MCS-eGFP	-	+	+	+	+	+	+	+
T1-pp65-eGFP	-	+	+	+	+	+	+	+

5.3 Stimulation von Spender-T-Zellen durch die etablierten T1 Zelllinien

5.3.1 Isolation von PBMC aus dem Vollblut und Ergebnisse der magnetischen Zellsortierung von T-Zellen

Für die Stimulationsexperimente mit den T1 Zelllinien wurden bei den Probanden aus 40ml Vollblut mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation jeweils zwischen 5×10^7 bzw. $1,2 \times 10^8$ PBMC isoliert. Durch die anschließende zweimalige magnetische Zellsortierung (über

CD3 Micro Beats) konnten aus den PBMC jeweils zwischen 1×10^7 und 4×10^7 T-Zellen isoliert werden. Dabei betrug die Reinheit der isolierten CD3+ T-Zellen über 99% (Abbildung 24).

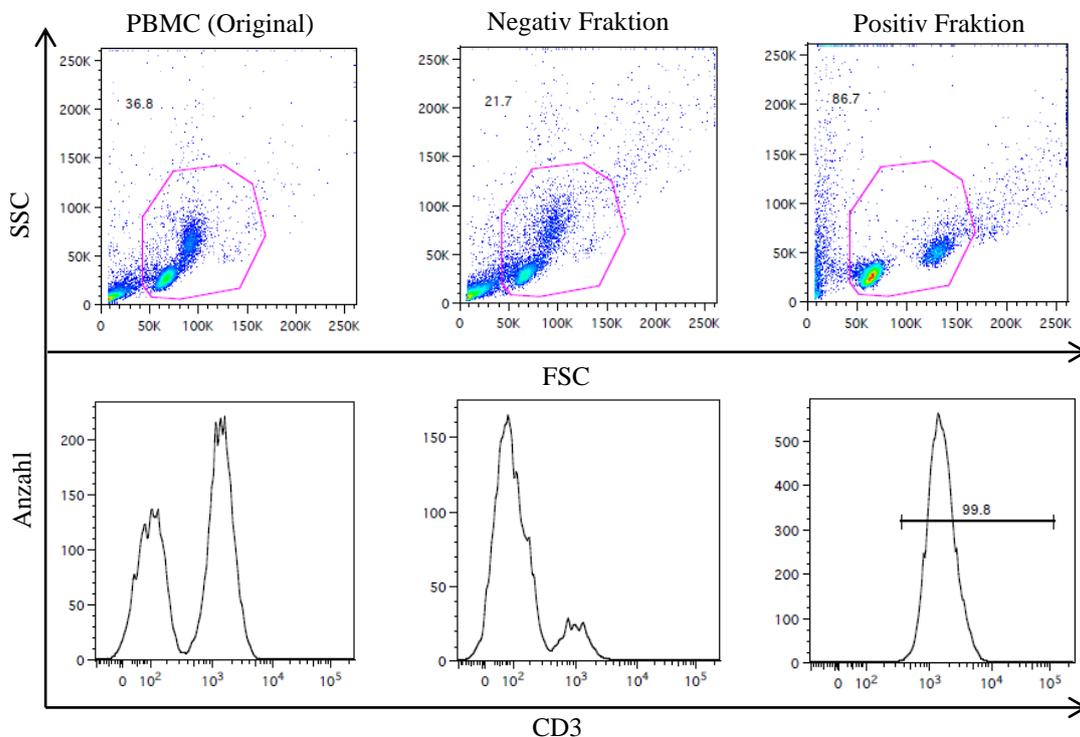


Abbildung 24: Beispiel zur durchflusszytometrischen Überprüfung der Reinheit von den mittels zweimaliger magnetischer Zellsortierung (über CD3 Micro Beats) isolierten T-Zellen (Positiv Fraktion) aus PBMC (Original). In der Positiv Fraktion sind Doubletten dargestellt, die zu 99,8% CD3+ sind.

5.3.2 Ergebnisse der Stimulation von CD8+ T-Zellen HLA-A2+ CMV+ Spender durch die Zelllinie T1-pp65-eGFP

Zunächst sollte durch Etablierungsversuche untersucht werden, inwiefern die über das piggyBacTm-Expressionsvektorsystem mit dem CMV-Antigen pp65 stabil-transfizierte Zelllinie T1-pp65-eGFP CD8+ T-Zellen von CMV-Spendern stimulieren kann. Dazu wurde die CD8+ T-Zell-Reaktion von sechs HLA-A2+/ CMV-sero-positiven Spendern auf T1-pp65-eGFP mit der CD8+ T-Zell-Reaktion auf T1-MCS-eGFP bzw. T1 verglichen. Diese Experimente dienen gleichzeitig zur Etablierung der experimentellen Bedingungen: Als Anzeigeparameter für die Stimulation von CD8+ T-Zellen wurden die Aktivierungsmarker CD25 und CD137 (4-1BB) etabliert. Die Punktediagramme wurden anhand einer festen Gating-Strategie (Abbildung 25) ausgewertet. Durch die vorherige Markierung der Spender-T-Zellen mit CFSE sollte zusätzlich das Proliferationsverhalten der CD8+ T-Zellen auf die jeweiligen T1 Zelllinien untersucht werden. Letztendlich konnte das aussagekräftigste Ergebnis erzielt werden, wenn jeweils 5×10^5

Spender-T-Zellen mit 1×10^5 Zellen der entsprechenden T1 Zelllinien für 72h in einer Rund-Well Platte in 200 μ l RPMI Medium (+10 FCS, +1% Penicillin/Streptomycin) stimuliert werden. Als Positiv-Kontrolle wurden 5×10^5 Spender-T-Zellen mit Phytohämagglutinin PHA (1 μ g) stimuliert, als Negativ-Kontrolle dienten die unstimulierten Spender-T-Zellen.

Auffällig ist, dass nicht nur T1-pp65-eGFP, sondern auch T1 und T1-MCS-eGFP die CD8+ T-Zellen von allen sechs getesteten HLA-A2+/CMV+ Spendern aktivieren. Diese Tatsache ist durch eine erhöhte Expression von CD25, bei einigen Spendern aber auch von CD137 (4-1BB) und einer verstärkten Proliferation (CFSE- CD25+) zu erkennen (Abbildung 26, 27 und 29). Trotz dieser generalisierten Aktivierung lassen sich bei allen CMV-Spendern Unterschiede zwischen der CD8+ T-Zell-Reaktion auf T1-pp65-eGFP und T1-MCS-eGFP bzw. T1 feststellen: So ist zum einen die Expression von CD25 auf den CD8+ T-Zellen der CMV-Spender nach Stimulation mit T1-pp65-eGFP signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon- Test) höher als nach Stimulation mit T1-MCS-eGFP (Abbildung 26). Zum anderen exprimieren die CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit T1-pp65-eGFP signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test) mehr CD137 (4-1BB) auf ihrer Oberfläche als nach der Stimulation mit den anderen beiden T1 Zelllinien (Abbildung 27). Am deutlichsten werden diese Unterschiede allerdings durch die Auswertung des prozentualen Anteils der Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen erkennbar. Mit CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen sind CD8+ T-Zellen gemeint, die sowohl positiv für CD25 als auch hoch positiv für CD137 sind. T1-pp65-eGFP führt bei den sechs HLA-A2+ CMV+ Probanden zu einer signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test) höheren Expression von CD8+ CD25+ CD137+ T-Zellen als die Zelllinien T1 und T1-MCS-eGFP (Abbildung 28). Diese Beobachtung wird bei der CD8+ T-Zell-Reaktion einiger Probanden durch die Formierung einer entsprechenden Subpopulation (CD8+ CD25+ CD137+ T-Zellen, oberer rechter Quadrant) in den Punktediagrammen unterstrichen (Abbildung 25). Jedoch war zur Auswertung des Proliferationsverhaltens dieser CD8+ CD25+ CD137+ T-Zellen in den meisten Fällen die durchflusszytometrisch gemessene Zellzahl zu gering (< 50 Zellen). Die Mittelwerte der durch T1 und T1-MCS-eGFP ausgelösten Expressionen von CD8+ CD137+ T-Zellen bzw. CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen liegen jeweils höher als nach Stimulation mit PHA. Dennoch sind zwischen diesen beiden T1 Zelllinien insgesamt keine signifikanten Unterschiede bei der Aktivierung von CD8+ T-Zellen der CMV-Spender zu verzeichnen.

Die beschriebenen Unterschiede in der CD8+ T-Zell-Reaktion der sechs HLA-A2+/CMV-seropositiven Spender auf die drei T1 Zelllinien spiegeln sich jedoch nicht im Proliferationsverhalten wider. Hier führte die Auswertung der CD8+ CFSE- CD25+ Zellen zu keinem statistisch signifikanten ($p > 0,05$, Wilcoxon Test) Ergebnis (Abbildung 29).

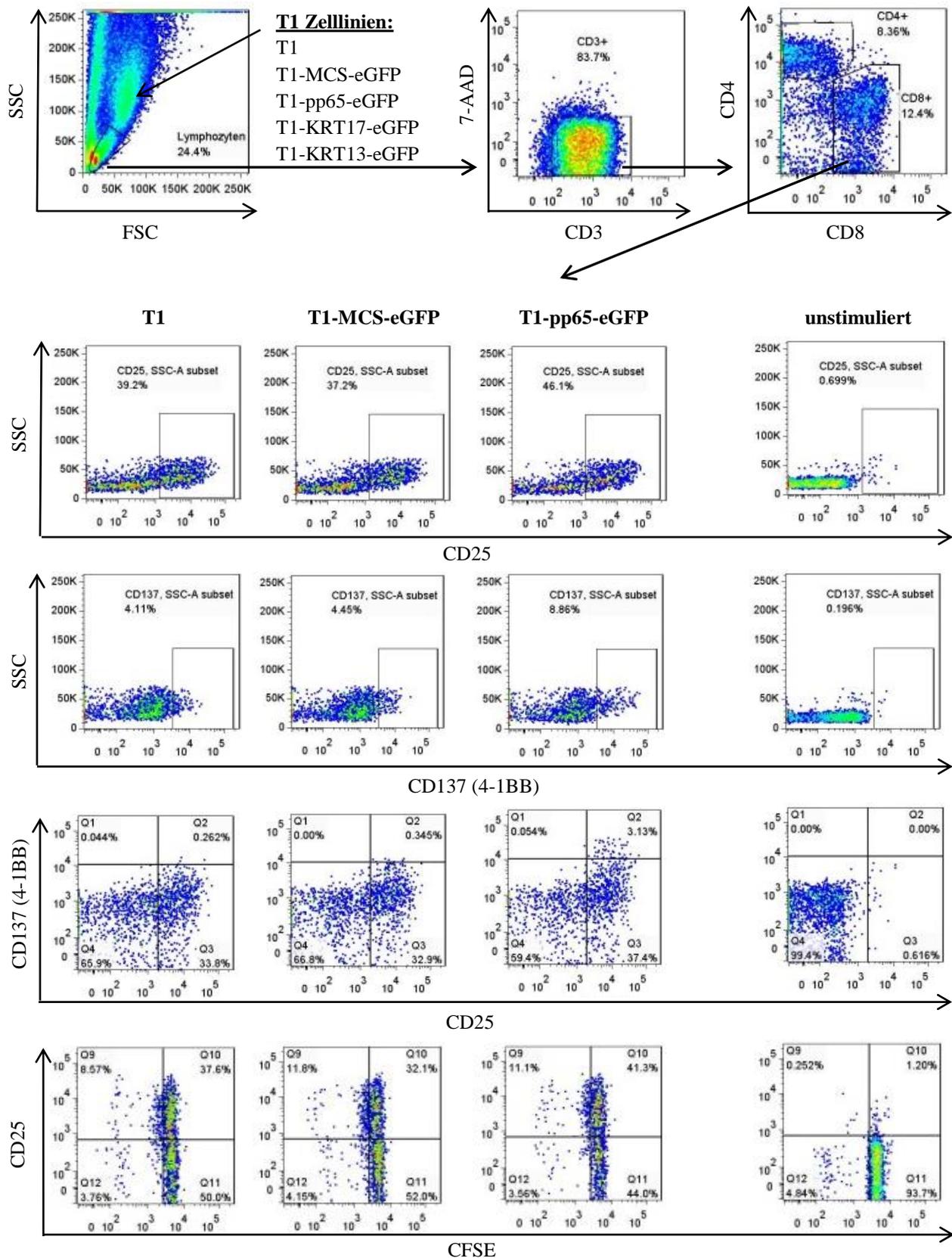


Abbildung 25: Gating-Schema zur Auswertung der CD8+ T-Zell-Reaktion auf die transfizierten T1 Zelllinien am Beispiel von CMV-Spender 3 (BD FACS LSRII). Die ebenfalls gefärbten unstimulierten T-Zellen dienen als Negativkontrolle. Anhand des Gates „CD137, SSC-A-subset“, insbesondere aber durch das Gate CD25+ CD137+ hoch positiv (oberer rechter Quadrant) sind die Unterschiede im Aktivierungsverhalten der CD8+ T-Zellen des CMV-Spenders auf T1, T1-MCS-eGFP bzw. T1-pp65-eGFP am deutlichsten erkennbar.

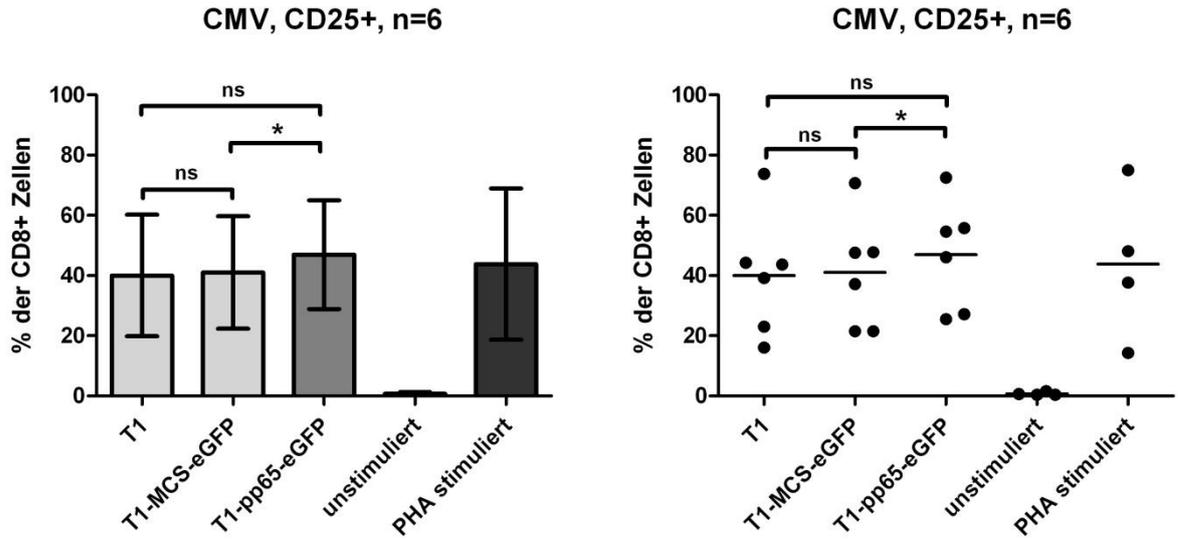


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Expression von CD25 auf CD8+ T-Zellen von sechs HLA-A2+/CMV-sero-positiven Probanden nach Stimulation (72h) mit den Zelllinien T1, T1-MCS-eGFP und T1-pp65-eGFP (BD FACSLSR II). Negativkontrolle: unstimulierte T-Zellen, Positivkontrolle: PHA stimulierte T-Zellen; * entspricht einer statistischen Signifikanz von $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test), ns: nicht signifikant. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (linkes Diagramm) sind dargestellt.

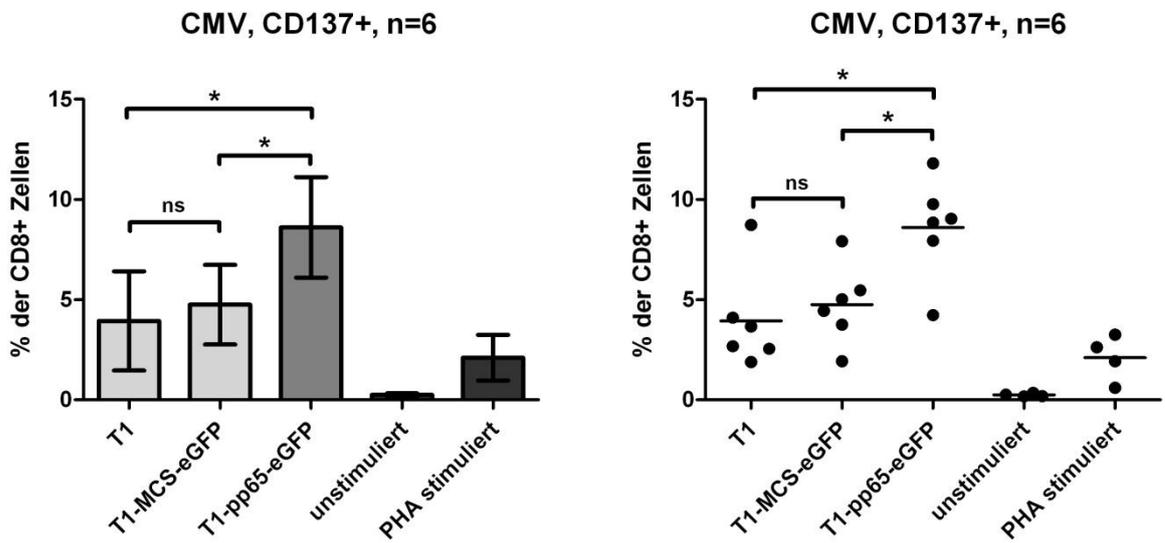


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Expression von CD137 (4-1BB) auf CD8+ T-Zellen von sechs HLA-A2+ CMV-sero-positiven Probanden nach Stimulation (72h) mit den Zelllinien T1, T1-MCS-eGFP und T1-pp65-eGFP (BD FACSLSR II). Negativkontrolle: unstimulierte T-Zellen, Positivkontrolle: PHA stimulierte T-Zellen; * entspricht einer statistischen Signifikanz von $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test), ns: nicht signifikant. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (linkes Diagramm) sind dargestellt.

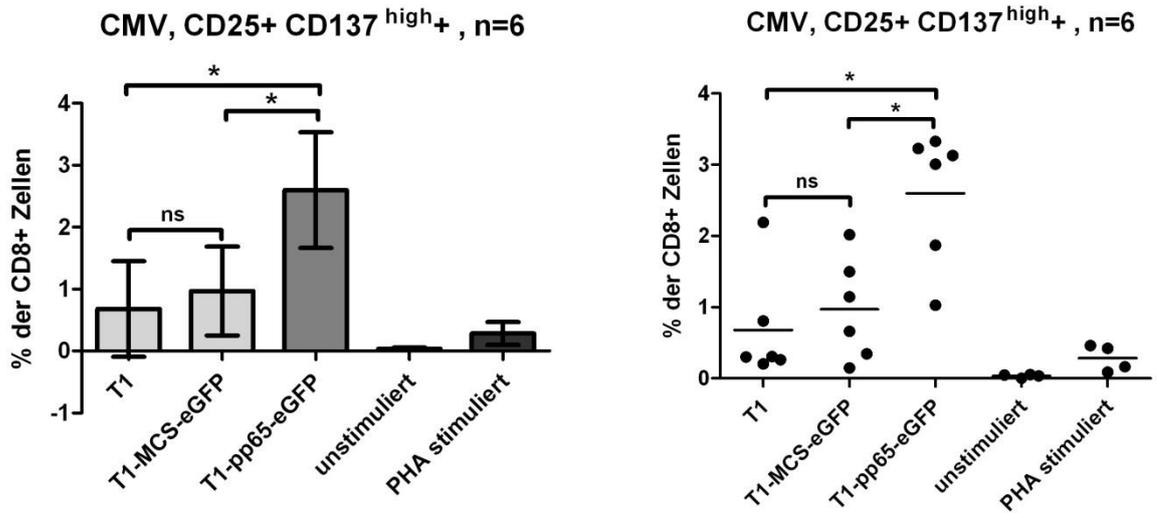


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen bei sechs HLA-A2+ CMV-sero-positiven Probanden nach Stimulation (72h) mit den Zelllinien T1, T1-MCS-eGFP und T1-pp65-eGFP (BD FACSLSR II). Negativkontrolle: unstimulierte T-Zellen, Positivkontrolle: PHA stimulierte T-Zellen; * entspricht einer statistischen Signifikanz $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test), ns: nicht signifikant. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (linkes Diagramm) sind dargestellt.

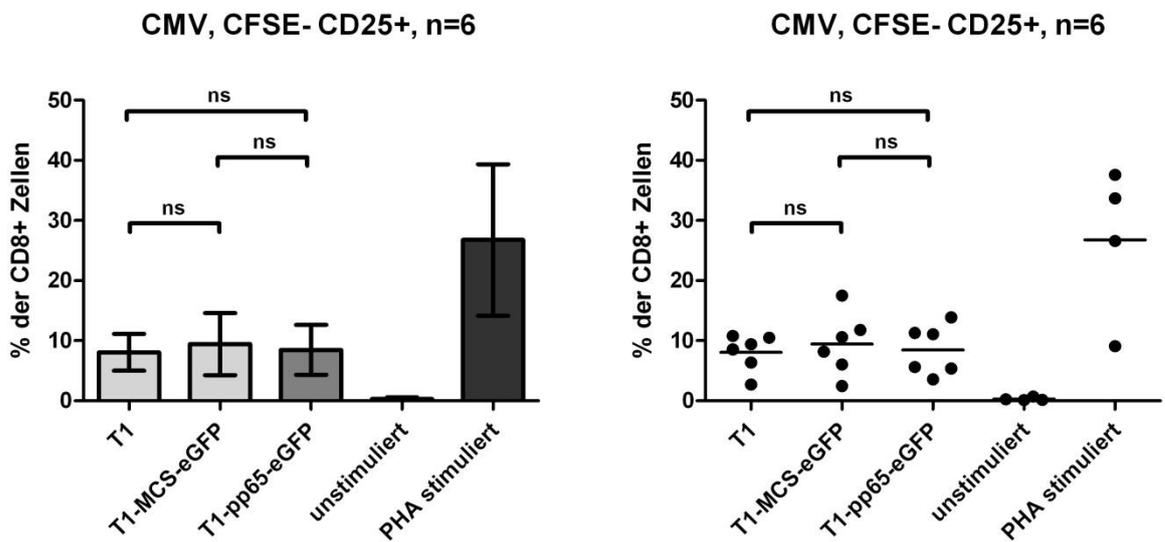


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Expression von CD25 auf CFSE- CD8+ T-Zellen bei sechs HLA-A2+ CMV-sero-positiven Probanden nach Stimulation (72h) mit den Zelllinien T1, T1-MCS-eGFP und T1-pp65-eGFP (BD FACSLSR II). Negativkontrolle: unstimulierte T-Zellen, Positivkontrolle: PHA stimulierte T-Zellen; * entspricht einer statistischen Signifikanz $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test), ns: nicht signifikant. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (linkes Diagramm) sind dargestellt.

5.3.3. Eingeschlossene Psoriasis-Patienten und ermittelte PASI-Scores

Nach der Isolation der PBMC und Oberflächenfärbung mit dem HLA-A2-FITC-Antikörper konnten von insgesamt 15 Psoriasis-Patienten acht Patienten durchflusszytometrisch als HLA-A2+ identifiziert und somit für die Stimulationsexperimente eingeschlossen werden. Die HLA-A2 Bestimmung der Patienten erfolgte am BD FACS Calibur nach dem in Abbildung 30 gezeigten Gating-Schema. Der für die acht HLA-A2+ Psoriasis-Patienten am Tag der Blutabnahme ermittelte PASI-Score (Schweregrad der Erkrankung) lag zwischen 7 und 13,8. In Tabelle 11 sind Angaben zu Alter, Geschlecht, Therapie und der am Untersuchungstag ermittelte PASI-Score der acht eingeschlossenen Psoriasis-Patienten zusammengefasst.

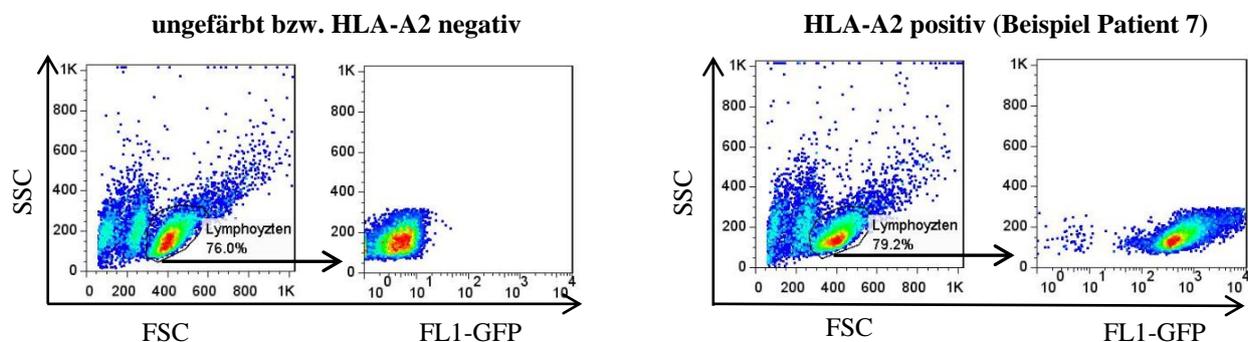


Abbildung 30: HLA-A2-Bestimmung auf PBMC der Psoriasis-Patienten. Die HLA-A2-Bestimmung der Psoriasis-Patienten erfolgte durchflusszytometrisch im BD FACS Calibur nach der Oberflächenfärbung der PBMC mit dem Antikörper HLA-A2-FITC.

Tabelle 11: Eingeschlossene HLA-A2+ typisierte Psoriasis-Patienten mit PASI-Score

<i>Patient</i>	<i>Alter/Geschlecht</i>	<i>Therapie</i>	<i>PASI-Score</i>
Patient 1	53, weiblich	systemisch, Fumarsäure (Fumaderm [®]) 2x1/Tag	7,4
Patient 2	65, männlich	lokal	12,6
Patient 3	61, weiblich	systemisch, Methotrexat 15mg/Woche	10,8
Patient 4	53, weiblich	lokal	8,8
Patient 5	48, weiblich	lokal	11,6
Patient 6	65, weiblich	systemisch, Methotrexat 20mg/Woche	13,8
Patient 7	53, männlich	lokal	9,6
Patient 8	51, weiblich	lokal	7

5.3.4 Ergebnisse der Stimulation von CD8⁺ T-Zellen HLA-A2⁺ Psoriasis-Patienten und HLA-A2⁺ gesunder Kontroll-Probanden durch die Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP

Nachdem in den Etablierungsexperimenten demonstriert werden konnte, dass T1-pp65-eGFP im Vergleich zu T1-MCS-eGFP und T1 bei sechs HLA-A2⁺/CMV-sero-positiven Probanden eine signifikant höhere Expression von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ (hoch positiv) T-Zellen auslöst, wurde unter diesem Aspekt die CD8⁺ T-Zell-Reaktion der acht eingeschlossenen HLA-A2⁺ Psoriasis-Patienten auf T1, T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP untersucht (Abbildung 32). Zur Kontrolle wurde auch die CD8⁺ T-Zell-Reaktion von sechs gesunden HLA-A2⁺ Kontroll-Probanden auf die genannten T1 Zelllinien getestet und nach demselben Gating-Schema ausgewertet (Abbildung 31). Ähnlich wie bei den sechs HLA-A2⁺/CMV-sero-positiven Spendern waren bei beiden Probandengruppen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ (hoch positiv) T-Zellen nach Stimulation mit T1 und T1-MCS-eGFP zu registrieren. Aus diesem Grund wurde sich zur weiteren Auswertung dazu entschlossen, die Expression von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ (hoch positiv) T-Zellen der Patienten und gesunden Probanden auf T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP jeweils allein mit der Reaktion auf die Referenz-Zelllinie T1-MCS-eGFP zu vergleichen.

Vergleicht man die CD8⁺ T-Zell-Antworten der sechs gesunden Kontroll-Probanden auf T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP mit denen der acht Psoriasis-Patienten, so fällt insbesondere anhand der Mittelwerte der Expression von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ T-Zellen die höher ausfallende generalisierte Aktivierung auf (Abbildung 33 und 34). Interessanterweise zeigen bereits die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen der Psoriasis-Patienten eine signifikant höhere ($p < 0,05$, Wilcoxon Test) Expression von CD8⁺ CD25⁺, CD8⁺ CD137⁺ bzw. CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ (hoch positiv) T-Zellen (Mittelwerte) als die der gesunden Kontrollprobanden (Abbildung 35), wobei jeweils keine Korrelation zum PASI-Score besteht (Abbildung 36). Bis auf einen gesunden Probanden, dessen CD8⁺ T-Zellen mit einer deutlich höheren Expression von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ T-Zellen auf T1-KRT13-eGFP antworteten (gesunder Kontroll-Proband 6 in Abbildung 31 und 38), sind bei den gesunden Kontroll-Probanden jeweils geringe bis kaum messbare Unterschiede in der Expression von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ T-Zellen auf die drei T1 Zelllinien feststellbar (Abbildung 33 und 38). Bei der CD8⁺ T-Zell-Reaktion der acht Psoriasis-Patienten auf die drei T1 Zelllinien zeichnete sich hingegen ein deutlich heterogeneres Bild ab (Abbildungen 34 und 39): So reagierten die T-Zellen von zwei Psoriasis-Patienten auf T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP mit höheren Expressionen von CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺

T-Zellen als auf T1-MCS-eGFP. Bei vier Psoriasis-Patienten fiel die Expression von CD8+ CD25+ CD137+ T-Zellen in Reaktion auf jeweils eine der Zelllinien T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP höher aus als nach der Stimulation mit T1-MCS-eGFP. Hierbei ist hervorzuheben, dass die CD8+ T-Zellen eines Patienten im Vergleich zu T1-MCS-eGFP mit einer besonders hohen Expression von CD8+ CD25+ CD137+ T-Zellen auf T1-KRT13-eGFP reagierten (Patient 2 in Abbildung 32 und 39). Bei zwei Psoriasis-Patienten reagierten die T-Zellen auf alle drei Zelllinien mit einer etwa gleichhohen Expression von CD8+ CD25+ CD137+ T-Zellen (Abbildung 34 und 39). Eine Korrelation des prozentualen Anteils der CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen nach Stimulation mit T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP zum PASI-Score der Psoriasis-Patienten konnte jedoch nicht gefunden werden (Abbildung 37). Insgesamt waren sowohl bei den sechs gesunden HLA-A2+ Kontroll-Probanden als auch bei den acht HLA-A2+ Psoriasis-Patienten keine signifikanten ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test) Unterschiede in der Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen nach Stimulation mit T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP zu verzeichnen (Abbildung 33 und 34).

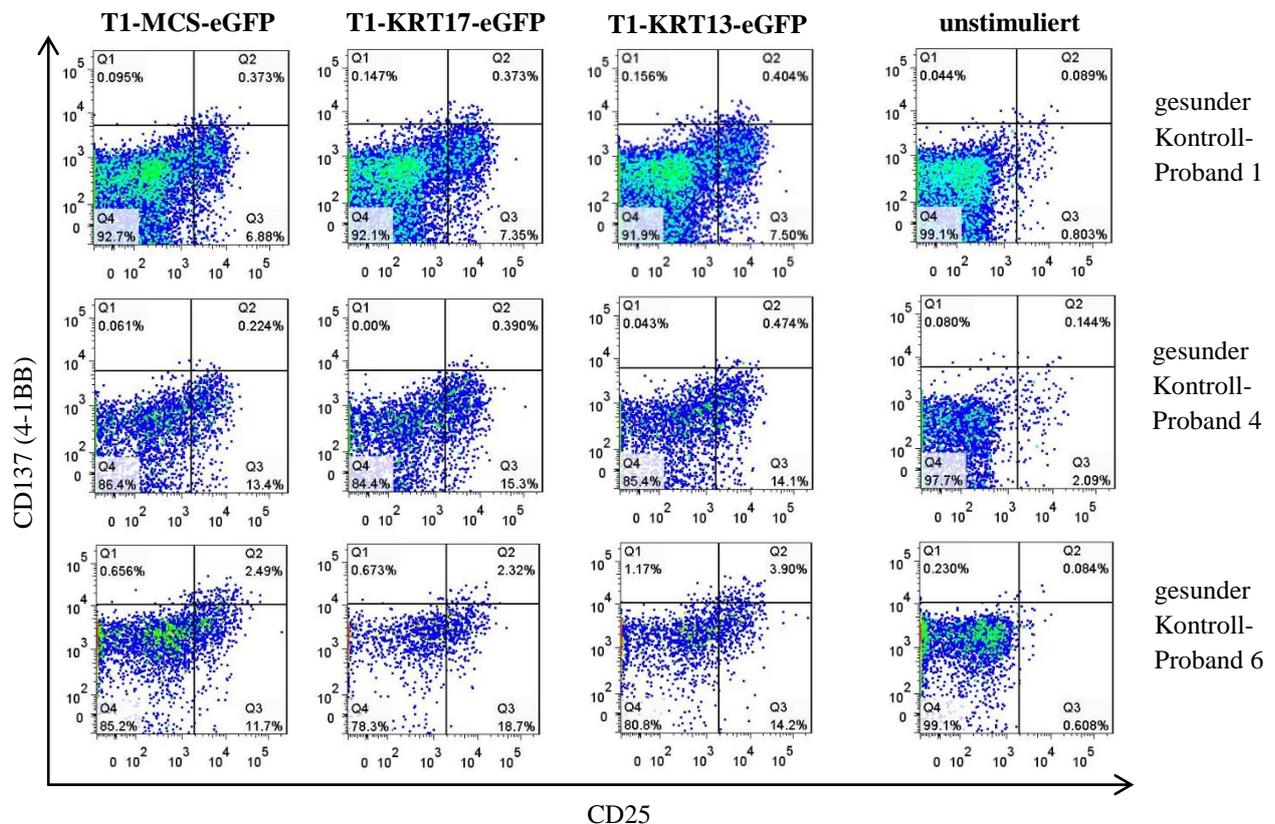


Abbildung 31: Die Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen (jeweils oberer rechter Quadrant in den Punktediagrammen) nach Stimulation (72h) mit den drei T1 Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP bei drei exemplarisch ausgewählten HLA-A2+ gesunden Kontroll-Probanden (BD FACS LSRII). Ebenfalls dargestellt ist die Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen bei den unstimulierten T-Zellen (Negativkontrolle) der entsprechenden Probanden.

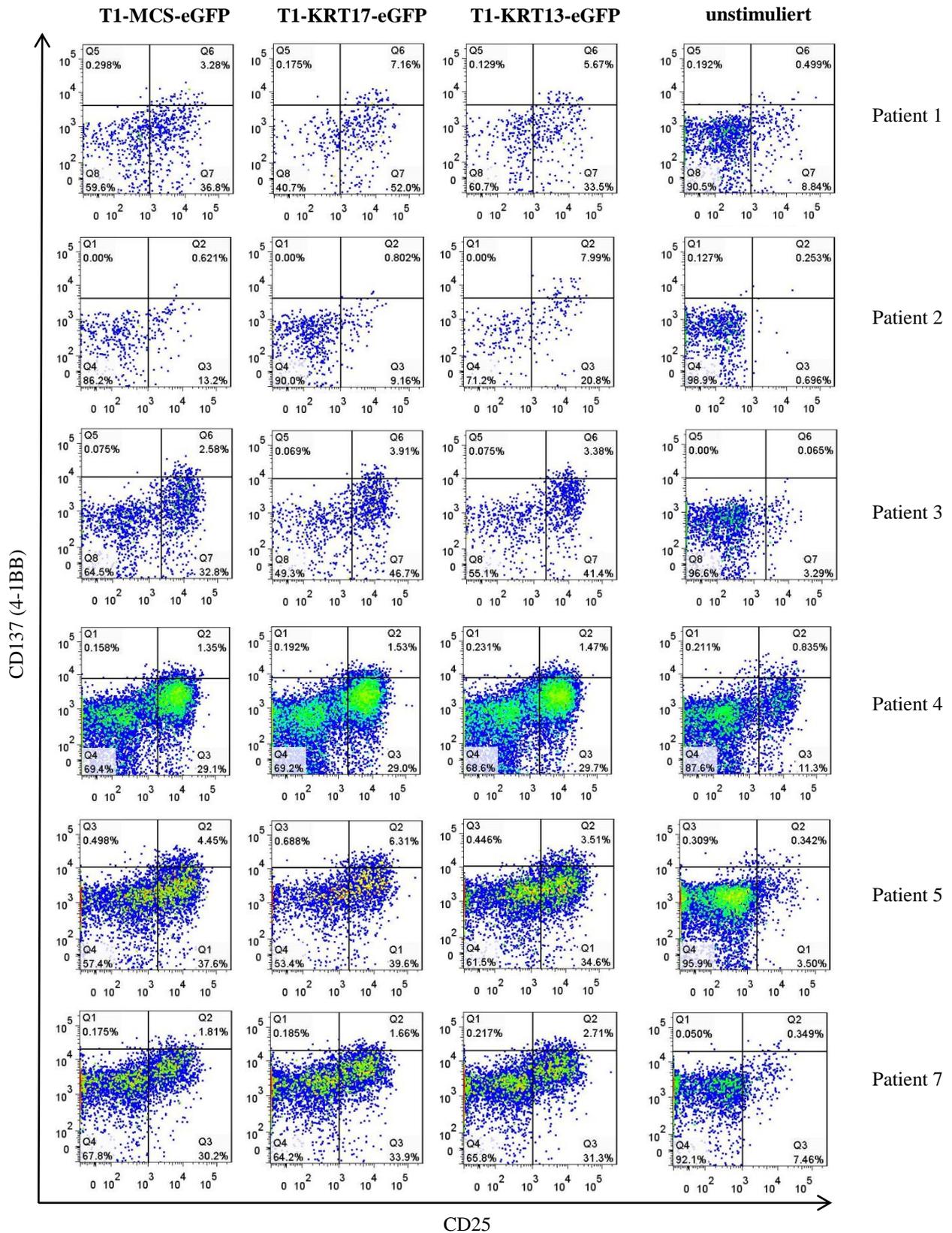


Abbildung 32: Die Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen (jeweils rechter oberer Quadrant in den Punktediagrammen) nach Stimulation (72h) mit den drei T1 Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP bei sechs exemplarisch ausgewählten HLA-A2+ Psoriasis-Patienten (BD FACS LSRII). Ebenfalls dargestellt ist die Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen bei den unstimulierten T-Zellen (Negativkontrolle) der entsprechenden Patienten.

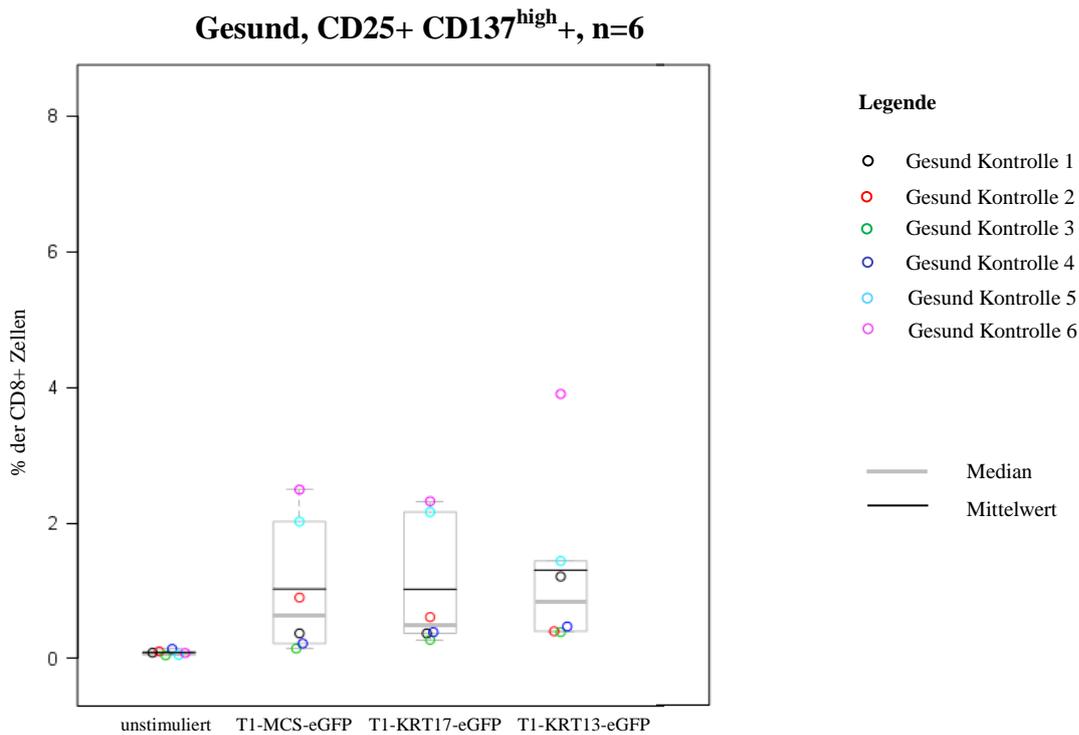


Abbildung 33: Graphische Darstellung (Boxplot) der Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen bei sechs HLA-A2+ gesunden Kontroll-Probanden nach Stimulation (72h) mit T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP. Negativkontrolle: unstimulierte T-Zellen. Bei der Reaktion auf die drei Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Wilcoxon-Test, $p > 0,05$)

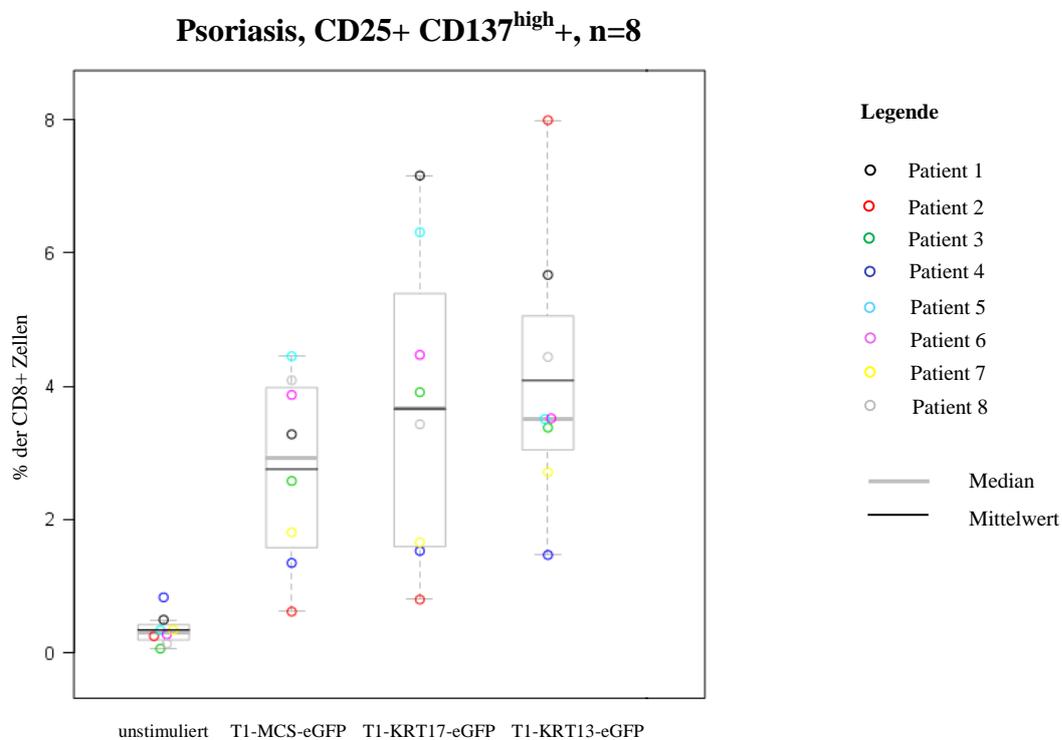


Abbildung 34: Graphische Darstellung (Boxplot) der Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen bei acht HLA-A2+ Psoriasis-Patienten nach Stimulation (72h) mit T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP. Negativkontrolle: unstimulierte T-Zellen. Bei der Reaktion auf die drei Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Wilcoxon-Test, $p > 0,05$)

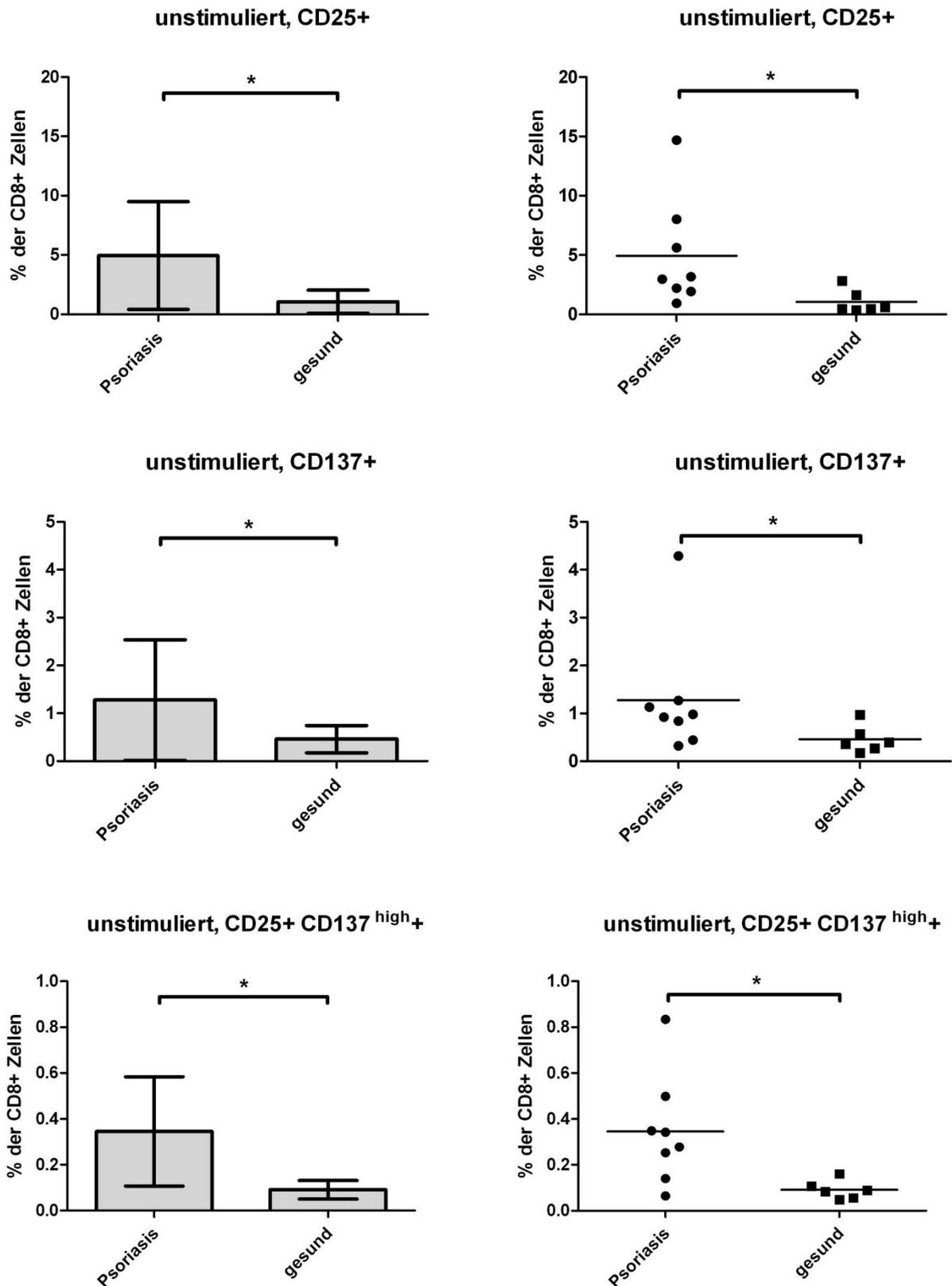


Abbildung 35: Graphische Darstellung der Expression von CD8+ CD25+ T-Zellen (oben), CD8+ CD137+ T-Zellen (mitte) und CD8+ CD25+ CD137^{high+} T-Zellen (unten) bei acht HLA-A2+ Psoriasis-Patienten und sechs gesunden Probanden nach 72h im unstimulierten Zustand. * entspricht einer statistischen Signifikanz von $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (jeweils linkes Diagramm) sind dargestellt.

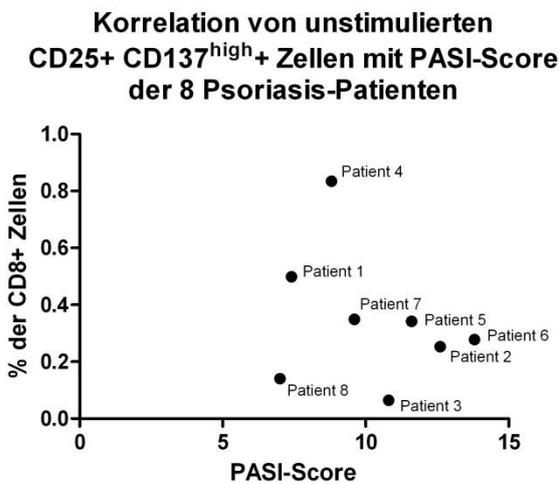
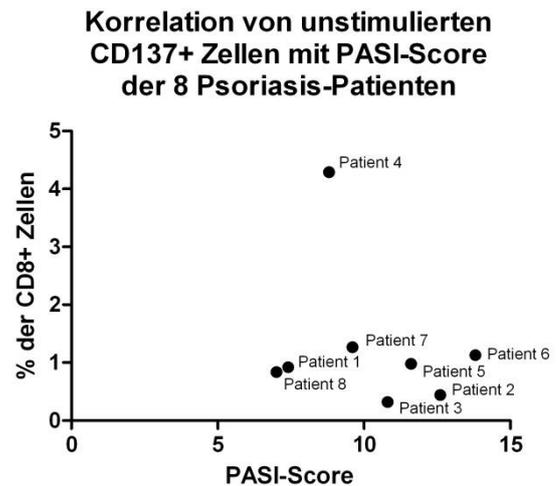
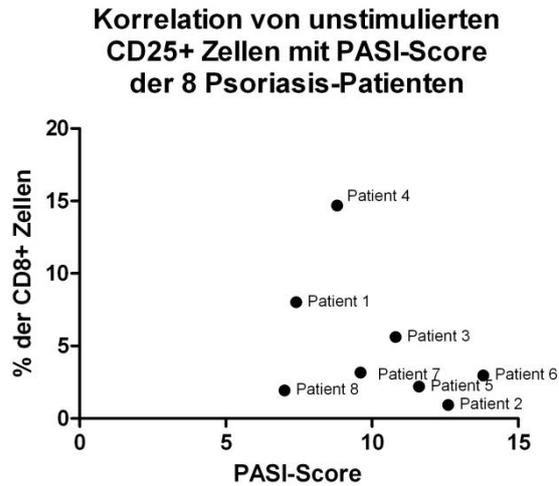


Abbildung 36: Graphische Darstellung des Schweregrades der Erkrankung (PASI-Score) bei acht HLA-A2+ Psoriasis-Patienten in Beziehung zum prozentualen Anteil von unstimulierten (nach 72h) CD8+ CD25+ (links oben), CD8+ CD137+ (rechts oben) bzw. CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen.

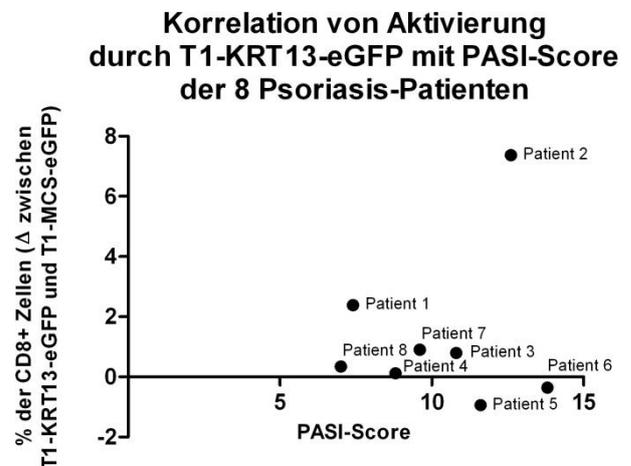
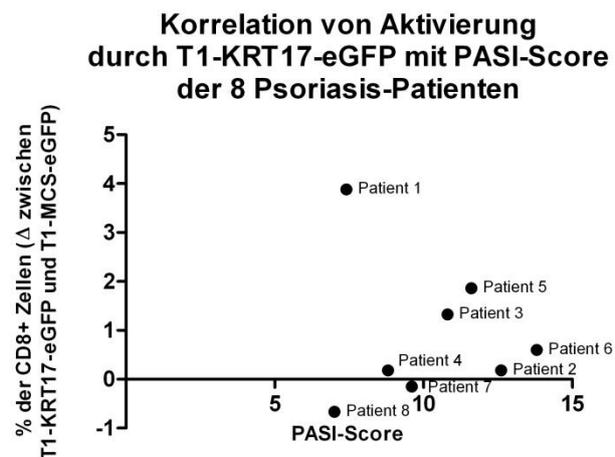


Abbildung 37: Graphische Darstellung des Schweregrades der Erkrankung (PASI-Score) bei acht HLA-A2+ Psoriasis-Patienten in Beziehung zur Differenz (Δ) zwischen dem prozentualen Anteil der CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen nach Stimulation (72h) mit T1-MCS-eGFP und T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP.

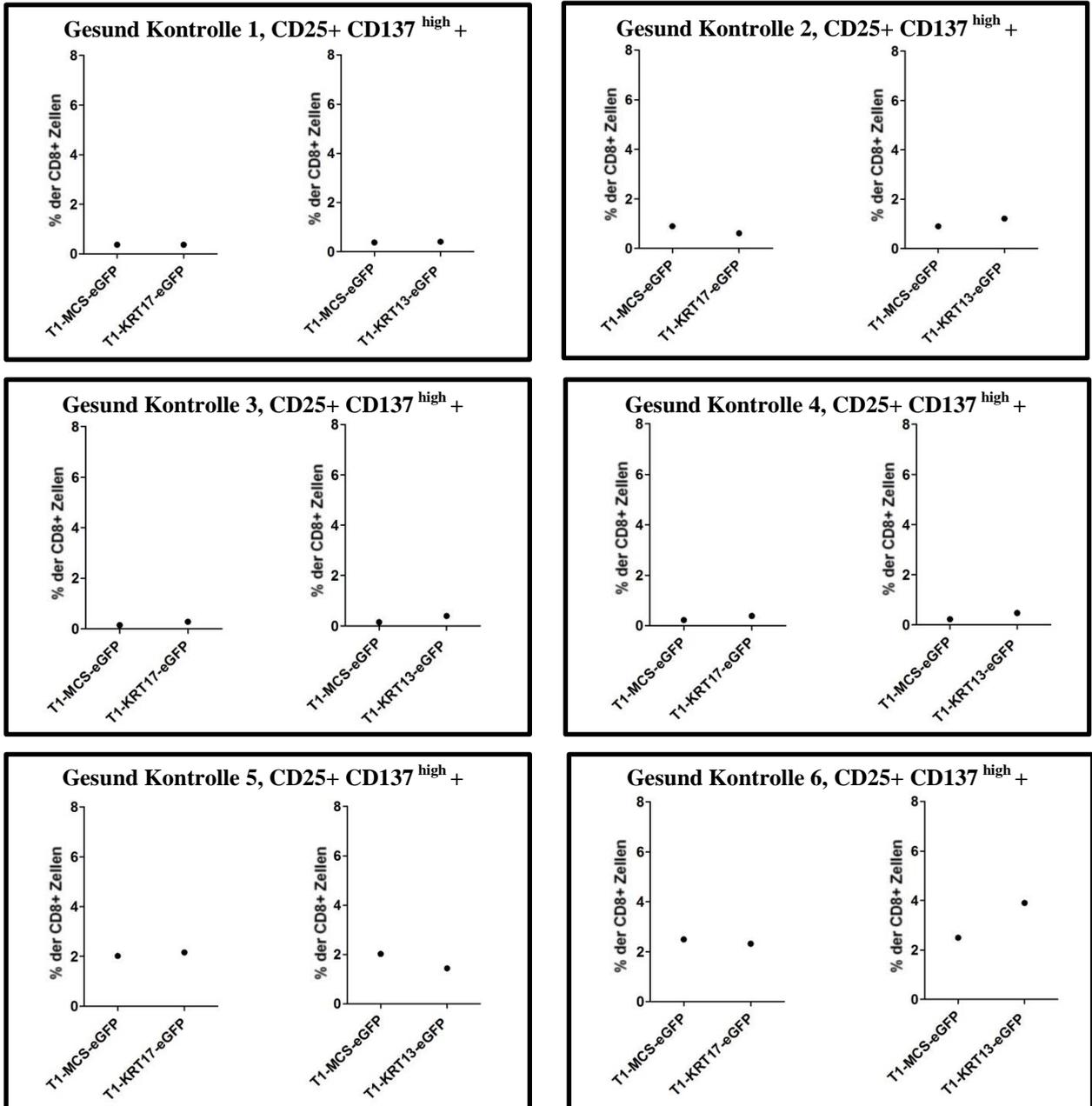


Abbildung 38: Graphische Einzeldarstellung der Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen bei sechs gesunden HLA-A2+ Kontroll-Probanden nach Stimulation (72h) mit den T1 Zelllinien T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP in Relation zur Stimulation mit der Referenz-Zelllinie T1-MCS-eGFP.

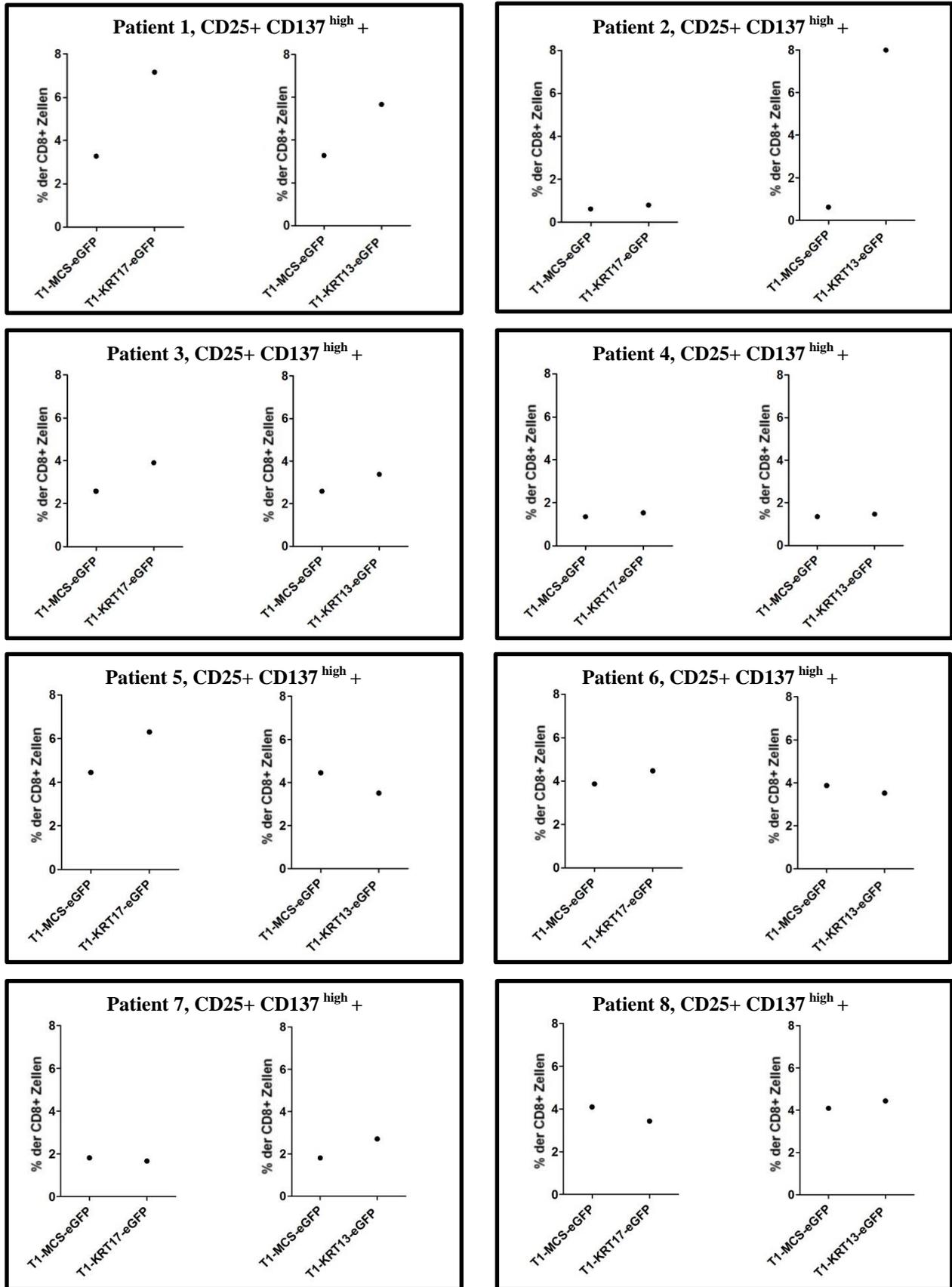


Abbildung 39: Graphische Einzeldarstellung der Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen bei 8 HLA-A2+ Psoriasis-Patienten nach Stimulation (72h) mit den T1 Zelllinien T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP in Relation zur Stimulation mit der Referenz-Zelllinie T1-MCS-eGFP.

6 Diskussion

Die Psoriasis ist eine chronische entzündliche Erkrankung der Haut, Nägel und Gelenke, deren Pathogenese noch nicht ganz aufgedeckt ist. Aufgrund der Beteiligung verschiedener Subpopulationen von u.a. autoreaktiven T-Zellen wird die Psoriasis heute als eine Autoimmunerkrankung verstanden und entsprechend mit immunsupprimierenden bzw. immunmodulierenden Medikamenten behandelt. Bisher konnten durch verschiedenste Methoden einige potentielle Autoantigene in der Psoriasis vulgaris identifiziert werden, wobei sich allerdings manche Arbeiten in ihren Ergebnissen widersprechen. Nicht zuletzt durch ihre Ähnlichkeit zum M-Protein der Streptokokken und der daraus hervorgehenden Hypothese über die Krankheitsentstehung (Molekulares Mimikry) kommen bestimmte Zytokeratine der Haut, insbesondere KRT17, am ehesten als Autoantigene für autoreaktive T-Zellen in Betracht ^{62,69}. Neben weiteren Zytokeratinen (z.B. KRT13)^{72,73} wird jedoch noch eine Vielzahl von anderen potentiellen Autoantigenen vermutet ⁷⁴. So könnte man annehmen, dass die T-Zellen eines jeden Patienten gegen bestimmte individuelle Muster von körpereigenen Antigen-Strukturen reagieren. Heutzutage wird neben den dermalen CD4+ T-Zellen immer mehr den autoreaktiven CD8+ T-Zellen eine kritische Rolle bei der Erkennung von Autoantigenen in der Psoriasis vulgaris zugeschrieben. Grund zu dieser Annahme geben zum einen die gefundenen Assoziationen mit bestimmten MHC-Klasse-I Molekülen, wie u.a. HLA-Cw6 und HLA-A2 ^{35,38-41}, zum anderen aber auch jüngste Untersuchungsergebnisse zum Aktivierungsgrad von CD8+ T-Zellen in der Epidermis von Psoriasis-Läsionen ^{53,71}. Da CD8+ T-Zellen Antigene bekanntermaßen über MHC-Klasse-I Komplexe erkennen, können potentielle Autoantigene theoretisch nicht nur z.B. durch die Zellen der Epidermis, sondern von allen kernhaltigen Zellen des Körpers präsentiert werden. Hierbei stößt die Forschung an autoreaktiven CD8+ T-Zellen bei der Erkennung von potentiellen Autoantigenen in Autoimmunerkrankungen, wie z.B. in der Psoriasis vulgaris, an seine Grenzen. Zudem ist die Untersuchung von Autoantigenen noch immer mit gewissen Einschränkungen verbunden: Zwar könnte man auch hier - wie in unserer Arbeitsgruppe bereits für andere Antigene etabliert - mit so genannten Peptidpools arbeiten, jedoch stellt diese Methode langfristig eine äußerst kostenaufwendige Angelegenheit dar.

An diesem Punkt liefert die vorliegende Arbeit ein neues und sehr interessantes Konzept: Auf der Grundlage der HLA-A2+ antigenpräsentierenden Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) sollte in vitro

die Reaktion von CD8⁺ T-Zellen auf stabil-transfizierte potentielle Autoantigene bei der Psoriasis modellhaft nachgebildet und getestet werden. Dazu wurde T1 jeweils mit dem CMV-Antigen pp65 (Kontroll-Antigen) bzw. den potentiellen Psoriasis-Autoantigenen KRT17 und KRT13 über das piggyBacTm-Transposon Expressionsvektorsystem erfolgreich stabil-transfiziert. Anschließend wurden durch mehrere durchflusszytometrische Zellsortierungsschritte reine T1 Zelllinien etabliert.

Letztendlich setzt sich die Arbeit in diesem Kapitel mit der zentralen Fragestellung auseinander, inwiefern die geschaffenen T1 Zelllinien CD8⁺ T-Zellen antigenspezifisch stimulieren können und somit für die Etablierung eines Testsystems zur Aufdeckung potentieller Autoantigene bei der Psoriasis vulgaris geeignet sind. Um die Frage zu beantworten, sollen an dieser Stelle zunächst die Eigenschaften der Zelllinie T1, vor allem aber auch exemplarisch die Ergebnisse der Stimulationsexperimente mit der etablierten Zelllinie T1-pp65-eGFP und den isolierten T-Zellen von sechs HLA-A2⁺/CMV-sero-positiven Spendern diskutiert werden. Abschließend werden die Ergebnisse der Experimente mit den Zelllinien T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP und den isolierten T-Zellen der acht HLA-A2⁺ Psoriasis-Patienten und sechs HLA-A2⁺ gesunden Kontroll-Probanden in den aktuellen Wissenstand über die Immunpathogenese der Psoriasis eingeordnet.

6.1 Begründung zur Auswahl der verwendeten APC-Zelllinie T1

Zur Realisierung des in dieser Arbeit angedachten Konzepts, musste als erstes eine APC-Zelllinie gefunden werden, die über ganz bestimmte Eigenschaften verfügt. Die Wahl fiel schließlich auf die HLA-A2⁺ humane APC-Zelllinie 174xCEM.T1 (T1). Ursprünglich wurden T1 und ihre mutierten Varianten zur Identifikation und Charakterisierung von HLA-Allelen verwendet^{84,85}. Heute dient T1 hauptsächlich zum Beladen von HLA-A2 restringierten Peptiden, um HLA-A2⁺ Splenozyten bzw. zytotoxische CD8⁺ T-Zellen mit peptidspezifischen TCR für weitere Versuche zu aktivieren^{86,87}. Auch vor diesem Hintergrund leistet die vorliegende Arbeit einen innovativen methodischen Beitrag: Es wurde untersucht, ob HLA-A2⁺ CD8⁺ T-Zellen auch dann antigenspezifisch durch T1 aktiviert werden, wenn die Zelllinie mit der vollständigen Nukleotidsequenz eines Antigens bzw. potentieller Autoantigene stabil-transfiziert wurde. Im Hinblick auf die Etablierung eines experimentellen Testsystems für Autoantigene bei Autoimmunerkrankungen kommt die hohe Prävalenz (ca. 50%) des HLA-A2-Allels unter

Kaukasiern sehr gelegen ⁸⁸, die sich auch in den HLA-A2-Bestimmungen der 15 getesteten Psoriasis-Patienten (8 von 15 Patienten waren HLA-A2+) widerspiegelte.

Als Grundvoraussetzung für diese Arbeit musste unbedingt gewährleistet sein, dass die stabil-transfizierten APC-Zelllinien die transfizierten Antigene auch prozessieren und als endogen-synthetisierte Peptide über ein MHC-Klasse-I Molekül (hier: HLA-A2) den CD8+ T-Zellen präsentieren können. Folglich wurde sich bewusst für T1 entschieden, und nicht für ihre mutierte Tochter-Zelllinie 174xCEM.T2 (T2). Bekanntermaßen exprimiert T2 auf der einen Seite deutlich weniger HLA-A2 als T1 ⁸¹. Andererseits exprimiert T2 durch Mutationen zwar keine MHC-Klasse-II-Moleküle mehr, sie ist mit dem damit einhergehenden Verlust der TAP-Gene (engl. Transporter associated with Antigen Processing) jedoch nicht mehr dazu in der Lage, endogen prozessierte Peptide auf MHC-I-Komplexen zu präsentieren ^{89,90}. Nichtsdestotrotz eignet sich T2 besonders gut, um von exogen mit Peptiden beladen zu werden und diese zytotoxischen CD8+ T-Zellen zu präsentieren ^{20,87,91}.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Die untersuchten Oberflächenmarker von T1 erfüllen die Anforderungen an eine professionell antigenpräsentierende Zelllinie

Prinzipiell verfügen nahezu alle kernhaltigen Zellen des Körpers neben ihrer eigentlichen Funktion zusätzlich über die Fähigkeit, Antigene auf ihrer Oberfläche über MHC-Klasse-I Komplexe zu präsentieren ⁹. Hierdurch können infizierte oder mutierte Körperzellen vom Immunsystem, v.a. von CD8+ T-Zellen erkannt werden. Hingegen besteht die Hauptaufgabe von so genannten „professionell“ antigenpräsentierenden Zellen, aufgenommene Antigene zu prozessieren, diese in Form von Peptiden auf vorrangig MHC-Klasse-II-Komplexen den T-Zellen zu präsentieren und sie gegebenenfalls zu aktivieren. Zu den professionell antigenpräsentierenden Zellen des Körpers zählen dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten ^{5,92}.

Die in dieser Arbeit verwendete humane APC-Zelllinie T1 stellt eine sehr interessante Zelllinie dar, weil sie offenbar Eigenschaften von professionell antigenpräsentierenden Zellen und von Körperzellen miteinander vereint: Zum einen wurde durch die Oberflächenfärbungen der Zelllinie deutlich, dass T1 mit den Oberflächenmarkern CD19 und CD83 wichtige Charakteristika von B-Lymphozyten bzw. dendritischen Zellen aufweist ^{93,94}. Zudem verfügt die

Zelllinie mit CD40, CD80 und CD86 auch über bekannte essentielle Co-Rezeptoren zur Aktivierung von T-Zellen^{12,95}. Der relativ hohe Anteil eines MHC-Klasse-II-Moleküls auf der Oberfläche (hier: HLA-DR7) ist ebenfalls charakteristisch für professionell antigen-präsentierende Zellen. Auf der anderen Seite weist T1 durch seinen besonders hohen Anteil des MHC-Klasse-I Moleküls HLA-A2 auf der Oberfläche ein typisches Merkmal von Körperzellen, wie z.B. Keratinozyten auf. Anhand der vorgenommenen Oberflächenfärbung der Zelllinien T1, T1-MCS-eGFP und T1-pp65-eGFP konnte zudem demonstriert werden, dass die Expression der genannten Oberflächenmarker auch nach der Transfektion der Antigene über Elektroporation mit anschließender viermaliger durchflusszytometrischer Zellsortierung unverändert bleibt. Folglich erfüllt T1 durch die konstante Expression von wichtigen Oberflächenmarkern zur Antigenpräsentation den in dieser Arbeit gesetzten Anspruch an ein, auf stabil-transfizierten APC-Zelllinien, basierendes Testsystem von Autoantigenen.

6.2.2 Beide Promotoren des verwendeten Expressionsvektorsystems sind in den transfizierten T1 Zelllinien aktiv

Um die stabil-transfizierten T1 Zellen zu sortieren und später die Reinheit der T1 Zelllinien zu erhöhen, wurden die Zelllinien mehrmals durchflusszytometrisch über den Reporter eGFP sortiert. Das grün fluoreszierende Signal des Reporters eGFP lieferte gleichzeitig den Beweis dafür, dass der SV40 CMV Promotor in T1-MCS-eGFP, T1-pp65-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP aktiv ist und somit das eGFP Gen in den Zellen exprimiert wird.

Weiterhin musste für die folgenden Stimulationsexperimente mit zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen unbedingt sichergestellt werden, dass auch die stabil-transfizierten Antigene bzw. potentiellen Autoantigene in den T1 Zelllinien unter dem humanen hEF1a Promotor exprimiert werden können. Allein für diesen Zweck, nämlich zur Expressionskontrolle des humanen Promotors hEF1a in T1, wurde die Zelllinie T1-eGFP-mCherry etabliert. Offensichtlich fluoresziert T1-eGFP-mCherry im BD FACS AriaII gleichzeitig grün (eGFP) und rot (mCherry). Dieses Ergebnis liefert den Beweis dafür, dass beide Promotoren im Genom der T1 Zelllinie gleichzeitig aktiv sein können. Obwohl sich vor beiden Reporter-Genen die identische Kozak-Sequenz⁸³ (GCCACC) befindet, fällt bei T1-eGFP-mCherry im Durchflusszytometer auf, dass das Fluoreszenz-Signal von eGFP unter dem humanen hEF1a Promotor deutlich stärker ist als das Signal von mCherry unter dem SV40 CMV Promotor. Auch in den anderen T1 Zelllinien fluoresziert das eGFP unter dem SV40 CMV Promotor nicht so hell wie unter dem hEF1a

Promotor in T1-eGFP-mCherry. Aus diesen Beobachtungen könnte man schlussfolgern, dass der humane hEF1a-Promotor in T1 aktiver ist als der SV40 CMV Promotor und dadurch auch die (Auto)Antigene pp65, KRT17 bzw. KRT13 in den anderen etablierten T1 Zelllinien unter hEF1a effektiver exprimiert werden.

6.2.3 T1 und die etablierten T1 Zelllinien lösen eine Alloreaktivität bei T-Zellen aus

Betrachtet man die Ergebnisse der Stimulationsexperimente der T-Zellen von den sechs HLA-A2+ CMV+ Spendern, acht HLA-A2+ Psoriasis-Patienten und den sechs HLA-A2+ gesunden Kontroll-Probanden mit den Zelllinien T1, T1-MCS-eGFP und T1-pp65-eGFP bzw. T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP in ihrer Gesamtheit, so lässt sich nicht verleugnen, dass alle fünf Zelllinien zu einer generalisierten Aktivierung von T-Zellen bzw. CD8+ T-Zellen führen. Diese Tatsache ist zunächst durch eine erhöhte Expression von CD25 und eine verstärkte Proliferation (CFSE- CD25+) im Durchflusszytometer deutlich erkennbar. Jedoch scheint es sich dabei nicht gerade um ein unbekanntes Phänomen zu handeln: Die beschriebene CD8+ T-Zell-Aktivierung ist am ehesten mit einer Alloreaktivität zu erklären. Unter dem Begriff Alloreaktivität wird eine Form der Kreuz-Reaktivität von bestimmten T-Zellen eines Individuums verstanden, bei denen der TCR auf Nicht-Selbst- bzw. allogene MHC-Komplexe oder auf von Selbst-MHC-Komplexen präsentierte Nicht-Selbst-Peptide reagiert ^{11,96}. Bei der ersten Form der Alloreaktivität können alloreaktive T-Zellen, unabhängig vom gebundenen Peptid, stark mit den Nicht-Selbst-MHC-Molekülen reagieren ⁹⁷. Offenbar ist diese häufige Form der Alloreaktivität bei den durchgeführten Stimulationsexperimenten sehr wahrscheinlich. Zwar konnte durch die HLA-A2-Typisierung der Spender-T-Zellen für die Stimulationsexperimente mit T1 eine grundlegende HLA-Kompatibilität gewährleistet werden, aber trotzdem blieb es unvermeidlich, dass andere fremde MHC-Komplexe auf T1 die Stimulationsexperimente beeinflussen könnten. In der Tat exprimiert T1 neben insbesondere einem hohen Anteil von HLA-A2 mit HLA-Aw30, -B5, -Bw4, -Bw6 noch weitere MHC-Klasse-I-Komplexe und mit HLA-DR7 zusätzlich einen MHC-Klasse-II-Komplex auf der Oberfläche ⁸¹. Eine nähere Bestimmung des HLA-Profiles der Spender-T-Zellen für die Stimulationsexperimente mit den transfizierten T1 Zelllinien wäre jedoch zu aufwändig und würde den Rahmen der Untersuchung sprengen. Außerdem ist nicht geklärt, wie stark sich die an die (Nicht)-Selbst-MHC-Komplexe gebundenen Peptide auf T1 von den körpereigenen Peptiden der Spender unterscheiden, denn zu große Diskrepanzen würden somit eine zweite mögliche Form der Alloreaktivität begünstigen ⁹⁶.

In einer anderen Überlegung könnte die generalisierte Aktivierung der T-Zellen durch T1 zusätzlich auch von seitens der Zelllinie sezernierter Zytokine bzw. Signale getriggert werden. So lösten in den Etablierungsexperimenten mehrere Anstrengungen, eine mögliche Alloreaktion bzw. Hintergrundaktivierung durch vorherige Bestrahlung mit ca. 35Gy⁸⁷ bzw. Fixierung mit 0,18% Paraformaldehyd⁹⁸ der T1 Zelllinien zu reduzieren, eine noch heftigere Aktivierung und gesteigerte Proliferation der T-Zellen aus (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall wäre die gesteigerte T-Zell-Antwort am ehesten durch von T1 sezernierte Apoptose- Signale erklärbar.

6.2.4 Die antigenspezifische CD8+ T-Zell-Aktivierung von HLA-A2+ CMV-sero-positiven Spendern auf T1-pp65-eGFP hebt sich von der Alloreaktivität auf die T1 Zelllinien ab

Zytotoxischen CD8+ T-Zellen wird eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von viralen Infektionen zugesprochen⁹⁹. Das humane Cytomegalievirus (HCMV) zählt zu den größten humanen Viren und wird durch etwa 160 Gene verschlüsselt¹⁰⁰. Heute weiß man, dass sich die CD8+ Gedächtnis-T-Zell-Antwort nicht gleichermaßen gegen alle diese Proteine richtet, sondern in erster Linie gegen das Tegument-Protein pp65⁷⁷. Folglich diente die Zelllinie T1-pp65-eGFP in dieser Arbeit als eine Positiv-Kontrolle des angedachten Testsystems und wurde zur Etablierung der experimentellen Rahmenbedingungen verwendet. Durch die stabile Transfektion der Nukleotidsequenz von pp65 in das Genom von T1 sollte simuliert werden, die APC-Zelllinie sei mit dem Zytomegalievirus (CMV) infiziert und exprimiere dessen Haupt-Antigen pp65 in Peptiden auf ihrer Oberfläche. In anderen Worten, durch die Stimulationsexperimente mit T1-pp65-GFP wurde exemplarisch der Frage nachgegangen, ob diese etablierte T1 Zelllinie tatsächlich die CD8+ T-Zellen von HLA-A2+/CMV-sero-positiven Probanden durch die Präsentation des stabil-transfizierten Antigenes pp65 antigenspezifisch aktivieren kann und somit stabil-transfizierte T1 Zelllinien zur weiteren Testung potentieller Autoantigene bei Psoriasis-Patienten geeignet sind. Hierbei wurde zum Vergleich jeweils auch die Reaktion der T-Zellen auf die Zelllinien T1-MCS-eGFP und T1 getestet. Da sich diese Arbeit die Etablierung eines Testsystems für Antigene/Autoantigene zum Ziel gesetzt hat, waren mehrere Etablierungsschritte notwendig, um die optimalen experimentellen Rahmenbedingungen und passenden Anzeigeparameter in Form von Aktivierungsmarkern zu definieren. So unterstreichen das ermittelte Zellverhältnis (APC: T-Zelle: 1:5), die Markierung der Spender-T-Zellen mit CFSE zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Proliferation, die gewählte Stimulationszeit (72h)

sowie die eingeführten Aktivierungsmarker CD25 und CD137 (4-1BB) zur durchflusszytometrischen Messung der Expression den hohen Anspruch der vorliegenden Arbeit. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, scheint die CD8⁺ T-Zell-Reaktion aller Probanden auf die T1 Zelllinien von einer Alloreaktivität geprägt zu sein. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse dieses Experiments gibt es jedoch mehrere Anhaltspunkte darauf, dass T1-pp65-eGFP die CD8⁺ T-Zellen der sechs CMV-Spender über die Alloreaktivität hinaus antigenspezifisch aktiviert. Zunächst kann die Expression von CD25 auf den CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit T1-pp65-eGFP genannt werden, die signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon Test) höher ist als nach Stimulation mit T1-MCS-eGFP. Im Vergleich zur Stimulation mit T1 ist knapp kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Trotzdem gilt als eigentliche (Negativ-) Kontrolle dieses Systems die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit T1-MCS-eGFP, denn diese T1 Zelllinie ist genauso wie T1-pp65-eGFP nach stabiler Transfektion eines piggyBacTm-Transposon Expressionsvektors durch Elektroporation und viermaliger durchflusszytometrischer Sortierung entstanden. Im Unterschied zum Expressionsvektor pPB-pp65-eGFP enthält der in diese Zelllinie transfizierte Vektor pPB-MCS-eGFP neben dem Reporter-Gen eGFP allerdings kein weiteres Antigen. Andererseits sollte die alleinige Auswertung der Expression von CD25 nicht überbewertet werden, denn anhand der Verteilung und Höhe der Werte verglichen zur Stimulation mit PHA (Positivkontrolle) erweist sich dieser Aktivierungsmarker hierbei als zu wenig spezifisch und drückt anscheinend eher eine mögliche Alloreaktivität aus¹⁰¹.

Einen stärkeren Beweis für eine stattgefundene antigenspezifische Stimulation kann hingegen die Auswertung der Expression des co-stimulatorischen Aktivierungsmarkers CD137 (4-1BB) aufzeigen: T1-pp65-eGFP ruft bei den CD8⁺ T-Zellen der CMV-Spender eine signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon- Test) höhere Expression von CD137 (4-1BB) hervor als T1-MCS-eGFP bzw. T1. Folglich bestätigt dieses Ergebnis die in der Arbeit von Wolfl et al. (2007) gezogene Erkenntnis, dass die Messung der Expression von CD137 im Vergleich zu CD25 und CD69 am geeignetsten ist, um antigenspezifisch aktivierte CD8⁺ T-Zellen zu charakterisieren²⁰. Wolfl et al. (2007) gingen methodisch jedoch ganz anders vor, indem sie HLA-A2 restringierte/Melan-A-spezifische T-Zell-Klone mit der TAP-defizienten Tochter-Zelllinie T2 stimulierten, die zuvor mit ausgewählten Peptiden von bestimmten Antigenen beladen wurde. Nach 24h Stimulation stellten sie auf den aktivierten CD8⁺ T-Zellen die höchste Expression von CD137 fest und identifizierten diesen Marker als Surrogatmarker für antigenspezifisch aktivierte CD8⁺ T-Zellen²⁰. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nukleotidsequenz des Antigens pp65 nicht nur in eine andere Zelllinie (T1) stabil-transfiziert, sondern auch die Gesamtheit der CD3⁺ T-Zellen von HLA-A2+/CMV-sero-positiven Spendern für 72h mit den transfizierten Zelllinien stimuliert.

Dennoch konnte ein signifikantes Ergebnis bei der Expression von CD137 auf CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit T1-pp65-eGFP im Vergleich zur Referenz-Zelllinie T1-MCS-eGFP bzw. T1 erzielt werden. Hieraus kann man schlussfolgern, dass T1 das stabil-transfizierte Antigen pp65 den CD8+ T-Zellen HLA-A2+ CMV-sero-positiver Spender in Peptiden über HLA-A2 präsentieren muss. Des Weiteren ist die durchflusszytometrisch gemessene Expression von CD137 auf den CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit T1-pp65-eGFP sogar signifikant höher als nach Stimulation mit PHA und lässt die Behauptung zu, dass PHA die CD8+ T-Zellen einiger Probanden vergleichsweise wenig antigenspezifisch aktiviert.

Noch glaubhafter kann die antigenspezifische Stimulation von CD8+ T-Zellen durch T1-pp65-eGFP aufgezeigt werden, wenn man insbesondere die Expression CD8+ CD25+ CD137^{high}+ (hoch positiv) T-Zellen auswertet: Diese ist nach Stimulation mit T1-pp65-eGFP verglichen zu T1 und T1-MCS-eGFP nicht nur signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon Test) am höchsten, sondern wird bei einigen CMV-Spendern sogar zusätzlich noch durch die Formierung einer entsprechenden Subpopulation im Durchflusszytometer untermauert. Wahrscheinlich stellen die hoch positiven Zellen der CD8+ CD25+ CD137+ Subpopulation das Korrelat zu spezifisch-aktivierten zytotoxischen CD8+ T-Zellen dar, die nach erfolgter Antigenerkennung von pp65-Peptiden auf T1-pp65-eGFP proliferieren, Zytokine produzieren und sich weiter differenzieren^{12,13,25,26}. Aus den Ergebnissen von anderen Stimulationsexperimenten, in denen PBMC von HLA-A2+ CMV-sero-positiven Spendern mit HLA-A2 restringierten pp65-Peptid-Tetrameren stimuliert wurden, ist bekannt, dass CMV-spezifische CD8+ T-Zellen spenderabhängig ca. 0,5-6% des CD8+ Repertoires stellen^{102 103}. Interessanterweise liegen die in dieser Arbeit gemessenen Anteile der CD8+ CD25+ CD137+ Subpopulation (1-3,5%) nach Stimulation mit T1-pp65-eGFP etwa in dem gleichen Bereich und bekräftigen abermals die Vermutung, dass es sich bei diesen hoch positiven Zellen um CMV-spezifische zytotoxische CD8+ T-Zellen handeln könnte. Da die Anzahl der antigenspezifisch aktivierten CD8+ CD25+ CD137+ T-Zellen in den durchgeführten Experimenten für weitere Aussagen zum Proliferationsverhalten häufig zu gering (<50 Zellen) war, konnte deren Proliferation nicht in die Auswertung der Experimente mit einbezogen werden. Ein zu geringer Anteil von antigenspezifischen Zellen könnte auch der Grund dafür sein, dass kaum Unterschiede im allgemeinen Proliferationsverhalten der CD8+ T-Zellen (CD8+ CFSE- CD25+) auf alle drei Zelllinien festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich also schlussfolgern, dass die Zelllinie T1, trotz einer induzierten Alloreaktivität bei den T-Zellen durchaus als APC-Zelllinie für das in dieser Arbeit angedachte Testsystem für potentielle Autoantigene von CD8+ T-Zellen z.B. bei Psoriasis-Patienten verwendet werden kann. Die Ergebnisse der durchgeführten CMV-Experimente zeigen auf, dass

man eine antigenspezifische Reaktion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen auf die mit Antigenen transfizierten T1 Zelllinien am besten durch die Messung des prozentualen Anteils von CD8⁺ CD137 (4-1BB)⁺ T-Zellen bzw. CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ (hoch positiv) T-Zellen erkennt und die Alloreaktion damit am deutlichsten in den Hintergrund stellt. Allerdings muss die Höhe der Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen auf eine mit einem bestimmten (potentiellen-) Antigen stabil-transfizierte T1 Zelllinie immer zumindest in Bezug auf die hervorgerufene Aktivierung durch die Referenz-Zelllinie T1-MCS-eGFP (mit antigen-leerem piggyBacTm-Expressionsvektor transfiziert) ausgewertet werden.

6.2.5 Die Ergebnisse der Stimulationsexperimente mit T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP geben einen Anhalt darauf, dass es sich bei KRT17 und KRT13 um potentielle Autoantigene von CD8⁺ T-Zellen in der Psoriasis handelt

Im Grunde genommen baut die vorliegende Arbeit auf der eingangs erwähnten Hypothese der Molekularen Mimikry zur Krankheitsentstehung der Psoriasis auf. So fiel bei der Auswahl der zwei zu klonierenden potentiellen Auto-Antigene die Wahl ganz bewusst auf KRT17, denn es sind insbesondere die Forschungsergebnisse zu KRT17⁷⁵, die die Hypothese der Molekularen Mimikry am eindrucklichsten stützen: Während einer durch beta-hämolyisierende Typ-A-Streptokokken ausgelösten Tonsillitis werden T-Zellen von Patienten innerhalb der Tonsillen auf das M-Protein sensibilisiert und bilden dabei durch eine erhöhte Expression von CLA Charakteristiken aus, die ihnen den Eintritt in die Haut erleichtern könnten⁶⁹. Daraufhin würden zytotoxische HLA-Cw6⁺ CD8⁺ T-Zellen von den Tonsillen in die Epidermis migrieren und insbesondere die mit dem M-Protein identische ALEEAN-Sequenz des Zytokeratins KRT17 erkennen, die von aktivierten Keratinozyten bzw. APC-Zellen präsentiert werden⁶³. Anhand anderer zahlreicher Studien über potentielle Autoantigene in der Psoriasis vulgaris erscheint der beschriebene Vorgang theoretisch auch für weitere Strukturen denkbar, wobei die CD8⁺ T-Zell-Reaktion auf viele dieser bereits identifizierten Peptide bzw. Zytokeratine (z.B. KRT13) bisher noch nicht detaillierter untersucht wurde^{72,73}. Die vorliegende Arbeit führt eindrucklich den Gedanken fort und setzt sich zum Ziel, basierend auf klonierten humanen HLA-A2⁺ APC-Zelllinien ein in vitro Testsystem für potentielle Autoantigene von autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen bei der Psoriasis bzw. Autoimmunerkrankungen zu etablieren. Einerseits sollte durch die Stimulationsexperimente mit der klonierten APC-Zelllinie T1-KRT17-eGFP eine stärkere Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen von Psoriasis-Patienten durch KRT17-Peptide verglichen zur

Zelllinie T1-MCS-eGFP nachgestellt bzw. bestätigt werden. Andererseits wurde durch T1-KRT13-eGFP mit KRT13 gleichzeitig ein weiteres potentiell Autoantigen untersucht und die Ergebnisse dieser Stimulationsexperimente den Ergebnissen der Stimulationsexperimente mit T1-KRT17-eGFP gegenübergestellt. Jedoch mussten für diese Arbeit aufgrund der Eigenschaften der verwendeten HLA-A2+ APC-Zelllinie T1 die experimentellen Rahmenbedingungen in verschiedenen Aspekten anders definiert werden: Erstens wurde zur Untersuchung der Aktivierung von CD8+ T-Zellen bewusst nicht die Sekretion des mit der Psoriasis vulgaris assoziierten Zytokins IFN- γ herangezogen^{69,75}. So wäre es denkbar, dass die durch T1 ausgelöste generalisierte Aktivierung sich entscheidend in einer erhöhten IFN- γ -Sekretion der CD8+ T-Zellen darstellt und somit die Ergebnisse sehr unspezifisch erscheinen lässt. Stattdessen wurde - wie bereits zuvor bei den Etablierungsexperimenten mit T1-pp65-eGFP demonstriert - die Häufigkeit von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen ausgewertet. Und zweitens vernachlässigt diese Arbeit die bei der Psoriasis am häufigsten gefundene Assoziation zu HLA-Cw6^{37-39,69}.

Obwohl in diesem Punkt nicht der Fokus der vorliegenden Arbeit lag, wiesen im Unterschied zu den sechs gesunden Kontroll-Probanden bereits die unstimulierten CD8+ T-Zellen der acht Psoriasis-Patienten (PASI-Score: 7-13,8) eine signifikant höhere Expression von CD25, CD137 bzw. gleichzeitige Expression von CD25 und CD137 (hoch positiv) auf. Dieser Tatbestand unterstreicht das Ergebnis einer Studie von Sigmundsdottir et al. (2001)⁷⁰, in der u.a. eine erhöhte Expression von CD25 auf CD8+ T-Zellen im Blut von Psoriasis-Patienten festgestellt wurde. Sigmundsdottir et al. (2001) konnte zudem eine Korrelation zwischen der Expression von CD25 auf CD8+ T-Zellen und dem Schweregrad bei moderater bis schwerer Erkrankung (PASI>10) zeigen⁷⁰, die sich in Ergebnissen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zeigte. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die vorliegende Arbeit aufgrund der geringeren Patientenzahl und anderen PASI-Score-Werte (7-13,8) weniger repräsentativ ist. Dennoch lässt die bei den Psoriasis-Patienten deutlich stärker ausfallende generalisierte Aktivierung der CD8+ T-Zellen durch die T1 Zelllinien ebenfalls darauf schließen, dass sich gewisse Populationen von T-Zellen bei der Psoriasis vulgaris in einem dysregulierten Zustand befinden⁵⁴.

Bei den gesunden Kontroll-Probanden zeigten die CD8+ T-Zellen von fünf Probanden geringe bis kaum messbare Unterschiede in der Reaktion auf T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP. Dennoch reagierte ein gesunder Kontroll-Proband mit einer deutlich höheren Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen auf T1-KRT13-eGFP als auf T1-MCS-eGFP. Obwohl bei Jones et al. (2004) bzw. Hagforsen et al. (2007) mit anderen methodischen Ansätzen gearbeitet wurde, reagierten interessanterweise auch in diesen Studien

die Serum-Proben von einigen gesunden Probanden stärker auf die identifizierten Autoantigene, u.a. ebenfalls auf KRT13^{72,73}. Ferner unterstützen auch die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die für Autoimmunerkrankungen allgemein anerkannte Theorie, dass eine dysregulierte inflammatorische Immunantwort entscheidend für den Ausbruch der Erkrankung sein kann¹⁰⁴. Bei der SEREX-Methode und anschließenden Ellispot-Analyse durch Jones et al. (2004) antworteten die gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten sogar zu nahezu gleichen prozentualen Anteilen mit einer stärkeren Reaktion auf u.a. KRT13⁷². Dies kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, denn im Unterschied zu dem einen gesunden Probanden reagierten die CD8+ T-Zellen bei gleich sechs von acht Psoriasis-Patienten auf mindestens eine der T1 Zelllinien T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP stärker als auf T1-MCS-eGFP. Genauer betrachtet reagierten die CD8+ T-Zellen von jeweils zwei Patienten entweder auf T1-KRT17-eGFP oder auf T1-KRT13-eGFP mit einer höheren Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen. Die CD8+ T-Zellen von zwei anderen Patienten zeigten sogar sowohl nach Stimulation mit T1-KRT17-eGFP als auch mit T1-KRT13-eGFP eine höhere Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen als nach Stimulation mit T1-MCS-eGFP. Das Reaktionsverhalten der CD8+ T-Zellen von diesen beiden Patienten wäre folglich mit einer Sensibilisierung gegenüber KRT17 und KRT13 zu erklären, die möglicherweise auf der signifikanten Homologie dieser beiden Zytokeratine beruhen könnte⁷².

Offensichtlich kann die CD8+ T-Zell-Reaktion der Psoriasis-Patienten auf T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP im Vergleich zu T1-MCS-eGFP sehr heterogen ausfallen. Weiterhin zeichnet sich im Vergleich zu den Ergebnissen der CMV-Etablierungsexperimente ab, dass die gemessenen Unterschiede im Aktivierungsverhalten der CD8+ T-Zellen stärker variieren können. So übertrifft bei einigen Patienten die durch T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP ausgelöste Aktivierung der CD8+ T-Zellen die Aktivierung durch T1-MCS-eGFP besonders deutlich, bei anderen Patienten sind die Unterschiede schlechter oder sogar gar nicht zu erkennen. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass einige Patienten zum Untersuchungszeitpunkt unter systemischer Therapie standen (Tabelle 11). Letztendlich konnte bei den acht Psoriasis-Patienten zwar kein signifikantes Ergebnis erzielt werden, aber im Gegensatz zu den sechs gesunden Probanden ist eindeutig ein Trend festzustellen: In Relation zu der durch T1-MCS-eGFP ausgelösten Aktivierung wurden die CD8+ T-Zellen der getesteten Psoriasis-Patienten über die Messung der Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen tendenziell stärker durch die beiden mit den Zytokeratinen KRT17 und KRT13 stabil-transfizierten T1 Zelllinien aktiviert als die CD8+ T-Zellen der gesunden Probanden.

Demzufolge erhärten die Ergebnisse der durchgeführten Stimulationsexperimente mit T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP die in der Literatur beschriebene Annahme, dass es sich bei KRT17 um ein Autoantigen von CD8+ T-Zellen in der Psoriasis vulgaris handelt ^{69,75}. Außerdem geben die Ergebnisse einen Anhalt darauf, dass KRT13 ebenfalls ein potentielles Autoantigen von CD8+ T-Zellen in der Psoriasis darstellt, da bei einigen Patienten sogar eine stärkere Aktivierung durch T1-KRT13-eGFP über die Messung der Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen demonstriert werden konnte ^{72,73}.

Interessanterweise zeigte der Aktivierungsgrad der CD8+ T-Zellen nach Stimulation mit T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP im Vergleich zu T1-MCS-eGFP bei den acht Psoriasis-Patienten keine Korrelationen zum ermittelten Schweregrad der Erkrankung (PASI-Score). Es bleibt jedoch fraglich, ob bei nur acht getesteten Psoriasis-Patienten bereits von einer unzureichenden Spezifität der Experimente im Bezug zum Schweregrad der Erkrankung gesprochen werden kann. Zur weiteren Erörterung dieser Fragestellung hätte möglicherweise eine Untersuchung zur Korrelation der Messergebnisse mit dem aktuellen Anteil von CLA+ CD8+ T-Zellen im Blut der Patienten einen wichtigen Beitrag leisten können ^{69,70}.

Nichtsdestotrotz kann man die Ergebnisse dieser Stimulationsexperimente nicht mit den statistisch signifikanten Ergebnissen der CMV-Etablierungsexperimente vergleichen. Mit seinem Protein pp65 stellt CMV eines der stärksten immundominanten Antigene des humanen Immunsystems dar und löst dabei eine beispiellose CD8+ T-Zell-Antwort aus ¹⁰⁵. Einer Studie zufolge reagieren die CD8+ T-Zellen von bis zu 92% der CMV-sero-positiven Spender besonders stark auf pp65 ¹⁰⁶. Folglich wurde das pp65-Gen in dieser Arbeit auch als Positiv-Kontrolle des etablierten Testsystems ausgewählt und tatsächlich antworteten alle sechs CMV-Probanden mit einer signifikant höheren Expression von CD8+ CD25+ CD137+ T-Zellen nach der Stimulation mit T1-pp65-eGFP als nach Stimulation mit T1-MCS-eGFP bzw. T1. Bei der Psoriasis vulgaris kommen jedoch individuell deutlich mehr Autoantigene in Frage, so dass es sich in Bezug auf die Erkennung von Antigenen/Autoantigenen durch T-Zellen um eine stärker heterogene Gruppe von Individuen handelt. Da die CD8+ T-Zellen der jeweiligen Psoriasis-Patienten so unterschiedlich stark auf T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP im Vergleich zu T1-MCS-eGFP reagierten, könnte ebenfalls die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die T-Zellen von Psoriasis-Patienten nicht nur ein einziges sondern jeweils ein ganz bestimmtes Set von Autoantigenen erkennen ^{72,107}. Weiterhin lassen die Ergebnisse die Überlegung zu, dass man zwischen drei Patientengruppen unterscheiden kann, deren T-Zellen entweder eine niedrige, mittlere oder starke Reaktivität gegenüber den untersuchten Autoantigenen zeigen. Um diese Behauptung näher zu untersuchen, müsste allerdings eine größere Anzahl von Patienten

eingeschlossen werden. Andererseits könnten bei den Patienten möglicherweise sogar einzelne Subsets von T-Zellen existieren, die spezifisch entweder auf KRT17, KRT13 oder weitere noch unbekannte Autoantigene reagieren. Letztendlich bleibt jedoch noch ungeklärt, ob sich mögliche KRT-spezifische T-Zellen in der Psoriasis tatsächlich vorrangig im Blut oder sogar eher in der Haut bzw. anderen Organen der Patienten aufhalten und somit durch eine Blutentnahme für die durchgeführten Stimulationsexperimente nur eingeschränkt zugänglich waren.

Im Unterschied zu anderen Methoden bietet das in dieser Arbeit angedachte und letztendlich etablierte Testsystem zur Identifikation von potentiellen Autoantigenen bei der Psoriasis vulgaris einige Vorteile: Erstens untersucht es *in vitro* die CD8⁺ T-Zellreaktion auf potentielle Autoantigene modelhaft auf der Basis von mit Antigenen stabil-transfizierten APC-Zelllinien. Dazu bedarf es lediglich einer Blutentnahme, Hautbiopsien der Patienten (vgl. Jones et al. (2004) und Hagforsen et al. (2007)) werden nicht benötigt^{72,73}. Zweitens stehen mit dem entwickelten piggyBacTm-Expressionsvektor T1-MCS-eGFP und dem Enzym Transposase bereits wichtige Instrumente zur Verfügung, um andere potentielle Psoriasis-Autoantigene zu klonieren und somit neue Autoantigen-exprimierende T1 Zelllinien zu schaffen. Dies könnte auch für potentielle Autoantigene von anderen Autoimmunerkrankungen umgesetzt werden. Schließlich eröffnet das etablierte Testsystem durch die Oberflächenfärbung von aktivierten lebenden T-Zellen gleichzeitig vielseitige Möglichkeiten zur weiteren Analyse der aktivierten Zellen.

6.3 Limitationen und methodische Einschränkungen dieser Arbeit

Mit dieser Arbeit wird ein innovativer experimenteller Ansatz vorgestellt, um potentielle Autoantigene in der Psoriasis vulgaris zu identifizieren. Die Grundlage des angedachten Testsystems stellt die Auswertung der *in vitro* Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen auf mit Antigenen stabil-transfizierte humane HLA-A2⁺ APC-Zelllinien dar. Hierfür wurde die HLA-A2⁺ APC-Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) ausgewählt. Zur Realisierung des angedachten Testsystems wurden das Antigen pp65 bzw. die potentiellen Autoantigene KRT17 und KRT13 jeweils in piggyBacTm-Expressionsvektoren kloniert, in T1 über Elektroporation transfiziert und schließlich über mehrere durchflusszytometrische Zellsortierungsschritte reine stabil-transfizierte T1 Zelllinien etabliert.

Offensichtlich fanden in diesem Projekt viele verschiedene Methoden ihre Anwendung. Bereits aus den Zielstellungen der vorliegenden Arbeit ist zu erkennen, dass der Erfolg des Projekts

entscheidend von den Eigenschaften und Qualitäten der ausgewählten humanen APC-Zelllinie T1, aber auch von den Rahmenbedingungen (z.B. gewählte Aktivierungsmarker, Stimulationszeit und Zellverhältnis) der durchgeführten Stimulationsexperimente abhängig war.

6.3.1 Grenzen der ausgewählten APC-Zelllinie

Zur Realisierung der Idee, ein auf einer APC-Zelllinie basierendes Testsystem für potentielle Autoantigene von CD8+ T-Zellen bei der Psoriasis zu etablieren, musste zu allererst eine APC-Zelllinie ausgewählt werden, die mehrere Voraussetzungen erfüllt: Einerseits sollte die Zelllinie über einen hohen Anteil von ausschließlich identischen MHC-Klasse-I-Molekülen (im Idealfall das mit Psoriasis assoziierte HLA-Cw6) auf der Oberfläche verfügen. Andererseits musste die Zelllinie die Fähigkeit besitzen, die stabil-transfizierten potentiellen Autoantigene in Peptiden über MHC-Klasse-I-Komplexe zu präsentieren. Diese hohen Ansprüche an eine passende APC-Zelllinie stellte die Suche nicht gerade vor eine leichte Aufgabe und man musste bei der Auswahl Kompromisse eingehen.

Letztendlich wurde sich für die APC-Zelllinie 174xCEM.T1 (T1) entschieden. T1 exprimiert neben dem MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DR7 und anderen HLA-A bzw. HLA-B Molekülen vor allem große Mengen von HLA-A2 auf ihrer Oberfläche, aber dafür kein HLA-Cw6^{38,69}. Das Fehlen von HLA-Cw6-Molekülen auf T1 sollte für die Etablierungsexperimente mit den CD8+ T-Zellen von HLA-A2+/ CMV-sero-positiven Probanden keine Rolle spielen. Allerdings war für die zusätzlich durchgeführten Stimulationsexperimente mit T-Zellen von HLA-A2+ Psoriasis-Patienten die häufig beschriebene Assoziation zu HLA-Cw6 nicht gegeben. Folglich drängt sich die Frage auf, inwieweit HLA-A2 die Rolle von HLA-Cw6 z.B. bei der Antigenpräsentation in der Psoriasis übernehmen bzw. vertreten kann. Demgegenüber konnte bereits in mehreren Studien bei Psoriasis-Patienten neben HLA-Cw6 auch eine Assoziation zu HLA-A2 oder anderen HLA-Komplexen festgestellt werden³⁸⁻⁴¹. Dennoch wäre eine stabile Transfektion von HLA-Cw6 in die entsprechenden T1 Zelllinien ein möglicher Ansatz zur Optimierung der Stimulationsexperimente mit T-Zellen von Psoriasis-Patienten. Abgesehen davon muss das auf der Zelllinie T1 basierende Testsystem nicht zwangsläufig nur zur Analyse von Autoantigenen bei der Psoriasis vulgaris verwendet werden, sondern kann durchaus auch bei anderen Autoimmunerkrankungen zur Untersuchung potentieller Autoantigene von CD8+ T-Zellen zum Einsatz kommen.

6.3.2 Grenzen der Transfektionsmethode und des verwendeten Expressionsvektorsystems

Nachdem mehrere Versuche fehlschlagen, die Zelllinie T1 über Lipofektion und CaPo4-Transfektion mit den Antigen-tragenden piggyBacTm-Transposon Expressionsvektorsystem und der Transposase (mPB) stabil zu transfizieren (Daten nicht gezeigt), blieb als letzte Möglichkeit die Elektroporation übrig. Auch in dieser Arbeit wurde der wesentliche Nachteil dieser Transfektionsmethode deutlich: Während der Großteil der T1 Zellen durch die hohen Spannungen in der Küvette starb, fingen die wenigen überlebenden Zellen erst nach ca. 3 Tagen wieder an zu wachsen. Schließlich konnten mittels Elektroporation die Antigene erfolgreich in T1 transfiziert und die Transfektionseffizienz anhand des Reporters eGFP kontrolliert werden. Dabei täuschte der anfänglich relativ hohe Anteil (25%) an transient-transfizierten T1 Zellen über die Tatsache hinweg, dass am Ende doch nur maximal 1% der Zellen stabil- transfiziert werden konnten. So waren jeweils vier durchflusszytometrische Zellsortierungsschritte notwendig, um nach etwa fünf Wochen, reine, stabil-transfizierte T1 Zelllinien zu etablieren. Dieses Procedere bedeutete nicht nur zusätzlichen Stress für die Zellen, sondern erforderte auch viel Geduld und einen hohen Zeitaufwand seitens des Untersuchers. Eventuell könnte durch die Methode des hyperaktiven piggyBac Gen Transfers eine höhere Anzahl von stabil-transfizierten Zellen erzielt und folglich die Zahl der Sortierungsschritte reduziert werden ¹⁰⁸. Auch die Anwendung eines lentiviralen Vektorsystems mit lentiviraler Transduktion der Antigene in das Genom der Zelllinie T1 würde möglicherweise zu einer höheren Transfektionseffizienz führen und einen geringeren Zeitaufwand bedeuten ¹⁰⁹. Bei dieser Transfektionsmethode müssten jedoch strengere Sicherheitsvorkehrungen, z.B. in Form eines S2-Labors eingerichtet werden. Auf der anderen Seite muss eine niedrige Transfektionseffizienz nicht prinzipiell nur von Nachteil sein. So ist es vorstellbar, dass sich mit steigender Transfektionseffizienz die Wahrscheinlichkeit multipler Integrationen und folglich die Anzahl instabiler Zellen erhöhen würde.

Das Enzym Transposase integriert die zwischen den Transposons liegenden klonierten Antigene und Reporter des piggyBacTm- Expressionsvektorsystems in einer beliebigen TTAA Region im Genom von T1. Dabei bleibt allerdings offen, inwieweit diese ungerichtete Integration andere wichtige Gene der Zelle an- oder abschaltet bzw. Prozesse innerhalb der Zelle beeinflusst ⁷⁸. Zu einer besseren Kontrolle über die Integration der Antigene in das Genom der Zelllinie könnte beispielsweise die aufkommende CrispR/Cas9-Technologie beitragen, die einen sequenzspezifischen Einbau von Nukleotidsequenzen in die Zelle ermöglicht und bereits in der Gentherapie Anwendung findet ¹¹⁰.

6.3.3 Grenzen der durchgeführten Stimulationsexperimente

Bei den ersten Etablierungsexperimenten mit den T-Zellen von CMV-Spendern wurde schnell klar, dass bereits T1 eine starke Hintergrundaktivierung von T-Zellen verursacht und somit die Aussagekraft des auf dieser Zelllinie basierenden Testsystems für Autoantigene von CD8⁺ T-Zellen beeinträchtigt wird. Zwar bleiben in der vorliegenden Arbeit die genauen Hintergründe dieser Aktivierung ungeklärt, aber es können verschiedene Ursachen diskutiert werden: Auf der einen Seite könnte die Hintergrundaktivierung möglicherweise durch von T1 sezernierte Zytokine getriggert werden, wobei keine weiteren Untersuchungen hinsichtlich dieser Fragestellung unternommen worden sind. Auf der anderen Seite spricht aufgrund der Charakteristiken der Zelllinie T1 vieles für eine Alloreaktivität der TCR der Spender-T-Zellen auf Nicht-Selbst- bzw. allogene MHC-Komplexe oder auf präsentierte Nicht-Selbst-Peptide bzw. allogene Peptide von T1.

Die Details einer möglichen Alloreaktivität sind in dieser Arbeit schwer nachvollziehbar, da ausschließlich mit unsortierten CD3⁺ T-Zellen gearbeitet wurde und die Spender T-Zellen bzw. PBMC vor den Versuchen nur auf das MHC-Klasse-I Molekül HLA-A2 überprüft worden sind. Eine genauere Typisierung der Spender PBMC bzw. T-Zellen auf zu T1 passende HLA-Klasse-I und II-Moleküle vor zukünftigen Stimulationsexperimenten könnte folglich einen wichtigen Beitrag zur Reduktion der Alloreaktivität leisten. Auf der anderen Seite würden umfangreichere Untersuchungen zu den HLA-Molekülen der Spender die Suche nach HLA kompatiblen Spendern zusätzlich erschweren und schließlich auch die Anwendungsmöglichkeiten des angedachten Testsystems deutlich einschränken. Trotzdem könnte zumindest die Kompatibilität des MHC-Klasse-II Moleküls HLA-DR7 auf den PBMC bzw. T-Zellen der Spender überprüft werden um zugleich die Aktivierung der mitgefärbten CD4⁺ T-Zellen auswerten zu können. Da in dieser Arbeit ausdrücklich die Reaktion von CD8⁺ T-Zellen auf die T1 Zelllinien untersucht werden sollte, wurde eine Testung der CD3⁺ Spender-T-Zellen auf HLA-DR7 nicht in Erwägung gezogen. In diesem Zusammenhang wäre es zudem äußerst interessant zu erfahren, wie stark die Hintergrundaktivierung bzw. Alloreaktivität und das Aktivierungsverhalten von ausschließlich reinen sortierten CD8⁺ T-Zellen durch die T1 Zelllinien ausfällt. Hierbei müsste jedoch diskutiert werden, inwiefern dieser experimentelle Aufbau tatsächlich die Realität widerspiegelt, da für eine adäquate CD8⁺ T-Zellantwort auf APC häufig die Unterstützung von CD4⁺ Effektor-T-Zellen notwendig ist ^{4,14}.

Mehrere Versuche, eine mögliche Alloreaktivität der T-Zellen auf T1 durch z.B. Bestrahlung oder Fixierung von T1 zu reduzieren, lösten sogar eine noch stärkere Aktivierung und

Proliferation der Spender-T-Zellen aus. Diese Feststellung würde wiederum den zusätzlichen Einfluss seitens von T1 sezernierter Zytokine bestärken. Ein weiterer Ansatz zur Einschränkung einer Alloreaktivität könnte darin gesehen werden, die Nicht-Selbst-MHC-Komplexe auf T1 vor den Stimulationsexperimenten mit entsprechenden Antikörpern zu blockieren.

Letztendlich wurde sich in dieser Arbeit dazu entschlossen, die von T1 ausgelöste Hintergrundaktivierung der T-Zellen bei der Auswertung der Stimulationsexperimente hinzunehmen. Stattdessen zielten die Etablierungsversuche vielmehr darauf ab, mit der Testung der experimentellen Rahmenbedingungen und entsprechenden Aktivierungsmarker sowie der passenden Gating-Strategie trotzdem eine antigenspezifische Aktivierung von CD8+ T-Zellen aufzuzeigen. So besteht eines der herausragenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darin, dass durch die Messung von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen höchstwahrscheinlich die Häufigkeit derjenigen CD8+ T-Zellen neben den alloreaktiven CD8+ T-Zellen identifiziert werden konnte, die tatsächlich antigenspezifisch auf die mit einem bestimmten Antigen transfizierte T1 Zelllinie reagierten. Da CD25 und CD137 in Abhängigkeit vom Stimulus bis zu ca. 5 Tage auf CD8+ T-Zellen nachweisbar sein können ^{16,18-20}, wurde zur zusätzlichen Untersuchung des Proliferationsverhaltens bewusst deren Expression nach 72h Stimulationszeit gemessen. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte jedoch unbedingt berücksichtigt werden, dass die Expression von CD137 (4-1BB) auf CD8+ T-Zellen nach 16-24 Stunden sein Maximum erreicht ²⁰. Demzufolge bleibt es ungewiss, inwiefern mittels der in dieser Arbeit gewählten Stimulationszeit von 72h noch eine repräsentative Anzahl von CD8+ CD137+ bzw. CD8+ CD25+ CD137+ T-Zellen durchflusszytometrisch dargestellt werden kann. Reaktionskinetische Untersuchungen nach festen Stimulationszeiten (z.B. 6h, 16h, 24h und 48h) in den Experimenten mit T1-pp65-eGFP könnten in diesem Gesichtspunkt mehr Klarheit verschaffen und die Ergebnisse weiter aufwerten.

Weiterhin kann in dieser Arbeit durch die Messung der Expression von CD25 und CD137 (4-1BB) keine Aussage darüber getroffen werden, um welche Art von CD8+ T-Zellen (z.B. naive, Effektor- oder Supressor-Zellen) es sich dabei genau handelt. Ein Vorteil ist, dass CD25 und CD137 (4-1BB) nach Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert werden und deshalb die Zellen zur durchflusszytometrischen Messung nicht fixiert werden müssen. Demnach eröffnet das etablierte Testsystem gute Möglichkeiten für weiterführende validierende Untersuchungen zur Identität und Herkunft der CD8+ CD25+ CD137+ T-Zell-Population. Hierzu könnten diese stimulierten CD8+ T-Zellen in größeren Reaktionsansätzen mit u.a. mehr T-Zellen (z.B. 2 Mio.) z.B. zunächst durchflusszytometrisch sortiert und nach Zugabe von IL-2 entsprechend vermehrt und kultiviert werden. Anschließend könnte beispielsweise eine Analyse der Expression von

bestimmten Genen, Transkriptionsfaktoren oder TCR erfolgen. Insbesondere für die Stimulationsexperimente mit T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP wäre es interessant, die aktivierten hoch positiven CD8⁺ CD25⁺ CD137⁺ T-Zellen auf die Expression von beispielsweise CLA^{69,70} näher zu untersuchen.

6.3.4 Offene Fragen und weitere Anregungen

Durch einen PCR-Nachweis konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass die Antigene bzw. potentiellen Antigene und Reporter stabil im Genom der jeweiligen T1 Zelllinien integriert sind. Mit der etablierten T1 Zelllinie T1-eGFP-mCherry wurde zudem durchflusszytometrisch nachgewiesen, dass beide Promotoren des verwendeten piggyBacTm-Expressionsvektorsystems gleichzeitig in T1 aktiv sein können und die stabil-transfizierten Gene exprimiert werden. Aus Zeitgründen wurden jedoch zwei bedeutende Untersuchungen ausgelassen: Zum einen fehlt ein validierender Nachweis dafür, dass die stabil-transfizierten Antigene auch auf Proteinebene in T1 prozessiert werden. Dies hätte z.B. mit Hilfe eines Western-Blots sichergestellt werden können. Viel entscheidender jedoch wäre es im Hinblick auf die Stimulationsexperimente mit den T-Zellen der Probanden gewesen, sicherzustellen, dass die transfizierten Antigene auch effektiv von T1 in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Hierfür könnte man die Oberfläche der T1 Zelllinien mit entsprechenden Antikörpern der Antigene pp65, KRT17 bzw. KRT13 färben und durchflusszytomtrisch überprüfen.

Bei der Auswertung der Stimulationsexperimente wurde sich neben der Beurteilung des Proliferationsverhaltens der T-Zellen über die Messung von CFSE ausschließlich auf die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD137 (4-1BB) auf den CD8⁺ T-Zellen konzentriert. Bisher wurde jedoch noch nicht erwähnt, dass unmittelbar nach den Stimulationsexperimenten und vor der Oberflächenfärbung die Überstände der jeweiligen Reaktionen abgetragen und separat in Reaktionsgefäße gefüllt wurden. Diese Überstände werden seitdem im Kühlschrank bei -80°C aufbewahrt. Fortführend könnte man die Überstände der einzelnen Reaktionen durch z.B. ELISA oder Multiplex-Analyse auf bestimmte Zytokine näher untersuchen. Für diese Untersuchung könnten u.a. die den jüngsten Studien zufolge mit Psoriasis assoziierten Zytokine IL-17A und IL-22 in Erwägung gezogen werden^{53,54}.

6.4 Ausblick und Anregungen für die Forschung

6.4.1 Validierung der Ergebnisse an einer größeren Patienten-Kohorte

Aus Zeitgründen konnte in dieser Arbeit nur bei acht HLA-A2+ Psoriasis-Patienten und sechs HLA-A2+ gesunden Kontroll-Probanden die CD8+ T-Zellreaktion auf die APC-Zelllinien T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP untersucht werden. Letztendlich lösten T1-KRT17-eGFP bzw. T1-KRT13-eGFP im Vergleich zu T1-MCS-eGFP bei sechs von acht Patienten unterschiedlich hohe Expressionen CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen aus, während die CD8+ T-Zellen nur eines gesunden Kontroll-Probanden deutlich stärker auf T1-KRT13-eGFP reagierten. Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass KRT17 und KRT13 tatsächlich Autoantigene von CD8+ T-Zellen in der Psoriasis sein könnten. Dennoch sind die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an den CD8+ T-Zellen von nur acht HLA-A2+ Psoriasis-Patienten und sechs gesunden Kontroll-Probanden vergleichsweise wenig repräsentativ, wenn man bedenkt, dass es sich bei Psoriasis-Patienten um ein sehr heterogenes Patientenkollektiv mit unterschiedlichen klinischen Manifestationen der Erkrankung handelt. Zur Validierung der etablierten Methode und gefundenen Ergebnisse sollten die Experimente an einer deutlich größeren Patienten-Kohorte bzw. Kohorte von gesunden Probanden durchgeführt werden. Bei dieser Gelegenheit könnte man zugleich anderen Fragestellungen detaillierter nachgehen: Gibt es möglicherweise Unterschiede in der CD8+ T-Zellreaktion auf die T1 Zelllinien in Abhängigkeit vom Alter oder Geschlecht der Patienten? Inwiefern korreliert der PASI-Score oder der Anteil von CLA+ CD8+ T-Zellen mit dem Ausmaß der CD8+ T-Zellreaktion auf die einzelnen mit Autoantigenen transfizierten T1 Zelllinien? Oder, wie verhält sich z.B. die CD8+ T-Zellreaktion auf die Zelllinien T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP von Patienten mit Psoriasis vulgaris im Vergleich zu Patienten mit Psoriasis inversa oder einer zusätzlichen Gelenkmanifestation? Zudem könnte untersucht werden, wie eine systemische Therapie das Reaktionsverhalten der CD8+ T-Zellen auf die T1 Zelllinien beeinflusst.

6.4.2 Untersuchung weiterer potentieller Autoantigene in der Psoriasis durch stabil-transfizierte T1 Zelllinien

Anhand des in dieser Arbeit etablierten Testsystems, basierend auf den Zelllinien T1-MCS-eGFP, T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP, wurde die Aktivierung von CD8+ T-Zellen über die Expression von CD8+ CD25+ CD137+ (hoch positiv) T-Zellen von acht Psoriasis-Patienten

und sechs gesunden Kontroll-Probanden exemplarisch auf die beiden potentiellen Autoantigene KRT17 und KRT13 näher untersucht. Dabei konnte bei einigen Psoriasis-Patienten nicht nur eine verstärkte Aktivierung durch das bekannte Autoantigen KRT17 bestätigt, sondern auch für das durch andere Methoden bereits identifizierte potentielle Autoantigen KRT13 aufgezeigt werden. Da die Aktivierung der CD8+ T-Zellen der acht Patienten nach Stimulation mit den Zelllinien T1-KRT17-eGFP und T1-KRT13-eGFP in Relation zur Referenzzelllinie T1-MCS-eGFP sehr heterogen ausfiel, erscheint es möglich, dass die CD8+ T-Zellen eines jeden Psoriasis-Patienten ein individuell unterschiedliches Repertoire von potentiellen Autoantigenen erkennen. Bisher durchgeführte Studien konnten zwar bereits eine Vielzahl von Autoantigenen in der Psoriasis identifizieren, eine unmittelbare Aktivierung von epidermalen CD8+ T-Zellen wurde jedoch nur für KRT17 beschrieben. Mit dem in dieser Arbeit etablierten Testsystem konnte am Beispiel von KRT13 ein Ansatz vorgestellt werden, um die Aktivierung von CD8+ T-Zellen auf bereits gefundene potentielle Autoantigene zu untersuchen bzw. zu bestätigen und folglich auch neue Autoantigen-Kandidaten in der Psoriasis vulgaris zu identifizieren. Als weitere potentielle Kandidaten-Autoantigene könnten z.B. Keratin 14, Keratin 16, FLJ00294, hnRNP-A1, Ezrin, Maspin, Peroxiredoxin 2 und das Hitzeschock-Protein 27 (HsP27) aber auch Peptidoglykan getestet werden^{61,68,72,74}. Vor diesem Hintergrund könnte man gleichzeitig auch das Reaktionsverhalten der CD8+ T-Zellen auf eine mit dem Streptokokken-M-Protein stabil-transfizierte T1 Zelllinie testen und vergleichen. Möglicherweise würde sich auch in diesem experimentellen Testsystem die beschriebene Kreuzreaktivität zwischen bestimmten Zytokeratinen (z.B. KRT17) und dem M-Protein bestätigen^{69,75}.

6.4.3 Klinische Anwendungsmöglichkeiten

Das in dieser Arbeit umgesetzte experimentelle Konzept zur Identifikation potentieller Autoantigene von CD8+ T-Zellen verfügt über das Potential, um in der zukünftigen Psoriasis-Diagnostik seine Anwendung zu finden und zur Optimierung der medikamentösen Therapie dieser Erkrankung beizutragen.

Hierzu müsste zunächst eine Bibliothek von reinen HLA-A2+ antigenpräsentierenden T1 Zelllinien angelegt werden, die jeweils mit unterschiedlichen potentiellen Psoriasis-Autoantigenen stabil-transfiziert wurden. Als diagnostische Untersuchung könnte dann die CD8+ T-Zell-Antwort von HLA-A2+ Psoriasis-Patienten auf jede dieser transfizierten T1 Zelllinien untersucht werden. Durch die genaue Kenntnis der individuellen Autoantigene wäre

folglich eine stärkere Anpassung des therapeutischen Vorgehens bei dieser Erkrankung vorstellbar.

Des Weiteren bildet dieses modelhaft entwickelte Testsystem eine Grundlage, um die antigenspezifisch aktivierten CD8⁺ T-Zellen der Patienten näher zu untersuchen. Nach der Sortierung und erneuten Stimulation der antigenspezifisch aktivierten CD8⁺ T-Zellen könnte beispielsweise eine Analyse von weiteren Oberflächenmolekülen oder sogar Transkriptionsfaktoren erfolgen. Aus diesen weiterführenden Untersuchungen könnte später theoretisch eine gezieltere Therapie auf Einzelzellniveau abgeleitet werden. Eine Möglichkeit stellt z.B. die Anwendung einer speziellen T-Zell-Depletion-Therapie dar, die bereits experimentell bei CD8⁺ T-Zellen in anderen Autoimmunerkrankungen getestet wurde^{111,112}. In ferner Zukunft könnte aus den gesammelten Erkenntnissen eventuell auch eine Impfung abgeleitet werden.

6.4.4 Anwendung bei anderen Autoimmunerkrankungen

Die Pathogenese vieler Autoimmunerkrankungen ist äußerst komplex und bleibt aufgrund der Beteiligung einer großen Vielfalt von unterschiedlichen Immunzellen und Mechanismen bis heute teilweise unverstanden. Während CD4⁺ Helfer-T-Zellen bekanntermaßen einen entscheidenden Beitrag bei der Aktivierung von B-Zellen in Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankungen leisten, war die Bedeutung von CD8⁺ T-Zellen bei diesen Erkrankungen lange Zeit unklar. Hingegen wird heute - nicht nur in der Psoriasis vulgaris - den CD8⁺ T-Zellen immer mehr eine kritische Rolle in der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen zugesprochen, in denen sie als Suppressor- oder zytotoxische Effektor-Zellen wirken können¹¹³. Vor kurzem erst ergaben Analysen von Hirnbiopsien bei Patienten, die sich in einem frühen Stadium der Multiplen Sklerose befanden, dass die Kortex-Läsionen von CD8⁺ T-Zellen infiltriert werden¹¹⁴. Hingegen ist bereits gut untersucht, dass CD8⁺ T-Zellen in frühen Stadien des Diabetes mellitus einen Großteil der in das Pankreas infiltrierenden Zellen ausmachen und eine Zerstörung der Betazellen einleiten³¹.

Es ist nicht auszuschließen, dass auch bei diesen Autoimmunerkrankungen CD8⁺ T-Zellen möglicherweise spezielle Autoantigene erkennen und somit die Pathogenese der Erkrankung beeinflussen. Schlussendlich könnte der in dieser Arbeit entwickelte Ansatz eines Testsystems für potentielle Autoantigene von CD8⁺ T-Zellen auch bei anderen Autoimmunerkrankungen einen Beitrag leisten, um weitere Autoantigene zu identifizieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Kenneth Murphy PT, Mark Walport. Janeway Immunologie. Vol 7. Auflage. 7. Auflage ed: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009:754.
2. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* Jul 6 2000;343(1):37-49.
3. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med.* Jul 13 2000;343(2):108-117.
4. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell. *Nat Immunol.* Sep 2003;4(9):835-842.
5. Yuseff MI, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Dumenil AM. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol.* Jul 2013;13(7):475-486.
6. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of. *J Immunol.* Apr 1 1986;136(7):2348-2357.
7. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis. *Nat Med.* Feb 2007;13(2):139-145.
8. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* May 26 2000;101(5):455-458.
9. Kenneth Murphy PT, Mark Walport. Janeway Immunologie. Vol 7. Auflage: Spektrum Akademischer Verlag 2009; 2009:227-257.
10. Sorrentino R, Bockmann RA, Fiorillo MT. HLA-B27 and antigen presentation: at the crossroads between immune defense and autoimmunity. *Mol Immunol.* Jan 2014;57(1):22-27.
11. Kenneth Murphy PT, Mark Walport. Janeway Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag 2009; 2009:258-259.
12. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:233-258.
13. Cerdan C, Martin Y, Courcoul M, Mawas C, Birg F, Olive D. CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. *Res Immunol.* Mar-Apr 1995;146(3):164-168.
14. Blazevic V, Trubey CM, Shearer GM. Analysis of the costimulatory requirements for generating human virus-specific in. *J Clin Immunol.* Jul 2001;21(4):293-302.
15. Sattler A, Wagner U, Rossol M, et al. Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation. *Blood.* Feb 26 2009;113(9):1948-1956.
16. Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:23-68.
17. Schoenbrunn A, Frensch M, Kohler S, et al. A converse 4-1BB and CD40 ligand expression pattern delineates activated regulatory T cells (Treg) and conventional T cells enabling direct isolation of alloantigen-reactive natural Foxp3+ Treg. *J Immunol.* Dec 15 2012;189(12):5985-5994.
18. Cannons JL, Lau P, Ghumman B, et al. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol.* Aug 1 2001;167(3):1313-1324.

19. Lee HW, Park SJ, Choi BK, Kim HH, Nam KO, Kwon BS. 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol.* Nov 1 2002;169(9):4882-4888.
20. Wolf M, Kuball J, Ho WY, et al. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8⁺ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood.* Jul 1 2007;110(1):201-210.
21. Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, et al. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol.* Oct 1993;23(10):2631-2641.
22. Pollok KE, Kim YJ, Hurtado J, Zhou Z, Kim KK, Kwon BS. 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells. *Eur J Immunol.* Feb 1994;24(2):367-374.
23. DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, Watts TH. Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol.* Jan 15 1997;158(2):551-559.
24. Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol.* May 15 2002;168(10):4897-4906.
25. Halstead ES, Mueller YM, Altman JD, Katsikis PD. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8⁺ T cell responses. *Nat Immunol.* Jun 2002;3(6):536-541.
26. Bukczynski J, Wen T, Ellefsen K, Gauldie J, Watts TH. Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 3 2004;101(5):1291-1296.
27. Mosmann TR, Li L, Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol.* Apr 1997;9(2):87-92.
28. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745-763.
29. Goodnow CC. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 19 1996;93(6):2264-2271.
30. Bach JF, Koutouzov S, van Endert PM. Are there unique autoantigens triggering autoimmune diseases? *Immunol Rev.* Aug 1998;164:139-155.
31. Wong CP, Stevens R, Long B, et al. Identical beta cell-specific CD8(+) T cell clonotypes typically reside in both peripheral blood lymphocyte and pancreatic islets. *J Immunol.* Feb 1 2007;178(3):1388-1395.
32. Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun Rev.* April - May 2014;13(4-5):490-495.
33. Christophers E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol.* Jun 2001;26(4):314-320.
34. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol.* Feb 2013;133(2):377-385.
35. Moll I JE, Augustin M. *Duale Reihe Dermatologie.* 7. Auflage, komplett überarbeitet ed: Thieme; 2010.
36. Psoriatic arthritis. 1973 1973;3(1):55-78.
37. Wuepper KD, Coulter SN, Haberman A. Psoriasis vulgaris: a genetic approach. *J Invest Dermatol.* Nov 1990;95(5):2s-4s.
38. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M. Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol.* Feb 1980;102(2):179-184.
39. Barker JN. Genetic aspects of psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* Jun 2001;26(4):321-325.

40. Kastelan M, Gruber F, Cecuk E, Kerhin-Brkljacic V, Brkljacic-Surkalovic L, Kastelan A. Analysis of HLA antigens in Croatian patients with psoriasis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 2000(211):12-13.
41. Vejbaesya S, Eiermann TH, Suthipinititharm P, et al. Serological and molecular analysis of HLA class I and II alleles in Thai patients with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens*. Oct 1998;52(4):389-392.
42. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*. Jun 26 1997;387(6636):861.
43. Henseler T, Christophers E. Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. Jun 1995;32(6):982-986.
44. Wolf R, Ruocco V. Triggered psoriasis. *Adv Exp Med Biol*. 1999;455:221-225.
45. Griffiths CE, Richards HL. Psychological influences in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. Jun 2001;26(4):338-342.
46. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today*. Mar 1995;16(3):145-149.
47. Voorhees JJ. Pathophysiology of psoriasis. *Annu Rev Med*. 1977;28:467-473.
48. Vanscott EJ, Ekel TM. KINETICS OF HYPERPLASIA IN PSORIASIS. *Arch Dermatol*. Oct 1963;88:373-381.
49. Mueller W, Herrmann B. Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med*. Sep 6 1979;301(10):555.
50. Baker BS, Swain AF, Fry L, Valdimarsson H. Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis. *Br J Dermatol*. May 1984;110(5):555-564.
51. Diani M, Altomare G, Reali E. T cell responses in psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmun Rev*. Nov 28 2014.
52. Conrad C, Boyman O, Tonel G, et al. Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat Med*. Jul 2007;13(7):836-842.
53. Cheuk S, Wiken M, Blomqvist L, et al. Epidermal th22 and tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. *J Immunol*. Apr 1 2014;192(7):3111-3120.
54. Cai Y, Fleming C, Yan J. New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cell Mol Immunol*. Jul 2012;9(4):302-309.
55. Whyte HJ, Baughman RD. ACUTE GUTTATE PSORIASIS AND STREPTOCOCCAL INFECTION. *Arch Dermatol*. Mar 1964;89:350-356.
56. Telfer NR, Chalmers RJ, Whale K, Colman G. The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. *Arch Dermatol*. Jan 1992;128(1):39-42.
57. Chang JC, Smith LR, Froning KJ, et al. CD8+ T-cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptors V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Ann N Y Acad Sci*. Jul 7 1995;756:370-381.
58. Prinz JC, Vollmer S, Boehncke WH, Menssen A, Laisney I, Trommler P. Selection of conserved TCR VDJ rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. *Eur J Immunol*. Oct 1999;29(10):3360-3368.
59. Manjula BN, Trus BL, Fischetti VA. Presence of two distinct regions in the coiled-coil structure of the streptococcal Pep M5 protein: relationship to mammalian coiled-coil proteins and implications to its biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 1985;82(4):1064-1068.
60. McFadden J, Valdimarsson H, Fry L. Cross-reactivity between streptococcal M surface antigen and human skin. *Br J Dermatol*. Nov 1991;125(5):443-447.
61. Valdimarsson H, Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, Gudjonsson JE, Johnston A. Psoriasis--as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol*. Oct 2009;30(10):494-501.

62. Sigmundsdottir H, Sigurgeirsson B, Troye-Blomberg M, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I. Circulating T cells of patients with active psoriasis respond to streptococcal M-peptides sharing sequences with human epidermal keratins. *Scand J Immunol*. Jun 1997;45(6):688-697.
63. Gudmundsdottir AS, Sigmundsdottir H, Sigurgeirsson B, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin Exp Immunol*. Sep 1999;117(3):580-586.
64. Baker BS, Brown DW, Fischetti VA, et al. Skin T cell proliferative response to M protein and other cell wall and membrane proteins of group A streptococci in chronic plaque psoriasis. *Clin Exp Immunol*. Jun 2001;124(3):516-521.
65. Baker BS, Laman JD, Powles A, et al. Peptidoglycan and peptidoglycan-specific Th1 cells in psoriatic skin lesions. *J Pathol*. Jun 2006;209(2):174-181.
66. Wang ZM, Liu C, Dziarski R. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *J Biol Chem*. Jul 7 2000;275(27):20260-20267.
67. Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol*. Feb 2004;40(12):877-886.
68. Baker BS, Powles A, Fry L. Peptidoglycan: a major aetiological factor for psoriasis? *Trends Immunol*. Dec 2006;27(12):545-551.
69. Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Love TJ, Valdimarsson H. Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8(+) T cells. *Clin Exp Immunol*. Oct 2004;138(1):83-93.
70. Sigmundsdottir H, Gudjonsson JE, Jonsdottir I, Ludviksson BR, Valdimarsson H. The frequency of CLA+ CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clin Exp Immunol*. Nov 2001;126(2):365-369.
71. Hijnen D, Knol EF, Gent YY, et al. CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN-gamma, IL-13, IL-17, and IL-22. *J Invest Dermatol*. Apr 2013;133(4):973-979.
72. Jones DA, Yawalkar N, Suh KY, Sadat S, Rich B, Kupper TS. Identification of autoantigens in psoriatic plaques using expression cloning. *J Invest Dermatol*. Jul 2004;123(1):93-100.
73. Hagforsen E, Sunnerberg K, Michaelsson G, Kampe O, Hedstrand H. Psoriasis autoantigens in normal scalp skin--identification by expression cloning. *J Invest Dermatol*. Vol 127. United States 2007;2276-2280.
74. Besgen P, Trommler P, Vollmer S, Prinz JC. Ezrin, maspin, peroxiredoxin 2, and heat shock protein 27: potential targets of a streptococcal-induced autoimmune response in psoriasis. *J Immunol*. May 1 2010;184(9):5392-5402.
75. Jin L, Wang G. Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis. *Med Res Rev*. Mar 2014;34(2):438-454.
76. Kenneth Murphy PT, Mark Walport. *Janeway Immunologie*. Vol 7. Auflage: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009.
77. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol*. Nov 1996;70(11):7569-7579.
78. Wilson MH, Coates CJ, George AL, Jr. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther*. Jan 2007;15(1):139-145.

79. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. Jun 1962;59:223-239.
80. Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. Feb 24 1977;265(5596):687-695.
81. Salter RD, Howell DN, Cresswell P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics*. 1985;21(3):235-246.
82. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica*. 1978;157(4):238-244.
83. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*. Oct 26 1987;15(20):8125-8148.
84. Koller BH, Orr HT. Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: analysis of two HLA-A alleles at the nucleotide level. *J Immunol*. Apr 1985;134(4):2727-2733.
85. Parham P, Lawlor DA, Lomen CE, Ennis PD. Diversity and diversification of HLA-A,B,C alleles. *J Immunol*. Jun 1 1989;142(11):3937-3950.
86. Vatakis DN, Koya RC, Nixon CC, et al. Antitumor activity from antigen-specific CD8 T cells generated in vivo from genetically engineered human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 20 2011;108(51):E1408-1416.
87. Kitchen SG, Bennett M, Galic Z, et al. Engineering antigen-specific T cells from genetically modified human hematopoietic stem cells in immunodeficient mice. *PLoS One*. 2009;4(12):e8208.
88. Ellis JM, Henson V, Slack R, Ng J, Hartzman RJ, Katovich Hurley C. Frequencies of HLA-A2 alleles in five U.S. population groups. Predominance Of A*02011 and identification of HLA-A*0231. *Hum Immunol*. Mar 2000;61(3):334-340.
89. Spies T, Bresnahan M, Bahram S, et al. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature*. Dec 20-27 1990;348(6303):744-747.
90. Hosken NA, Bevan MJ. Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science*. Apr 20 1990;248(4953):367-370.
91. Amrolia PJ, Reid SD, Gao L, et al. Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity. *Blood*. Feb 1 2003;101(3):1007-1014.
92. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
93. Tedder TF. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. Oct 2009;5(10):572-577.
94. Erbacher A, Gieseke F, Handgretinger R, Muller I. Dendritic cells: functional aspects of glycosylation and lectins. *Hum Immunol*. May 2009;70(5):308-312.
95. Munroe ME. Functional roles for T cell CD40 in infection and autoimmune disease: the role of CD40 in lymphocyte homeostasis. *Semin Immunol*. Oct 2009;21(5):283-288.
96. Nesic D, Maric M, Santori FR, Vukmanovic S. Factors influencing the patterns of T lymphocyte allorecognition. *Transplantation*. Mar 15 2002;73(5):797-803.
97. Jankovic V, Remus K, Molano A, Nikolich-Zugich J. T cell recognition of an engineered MHC class I molecule: implications for peptide-independent alloreactivity. *J Immunol*. Aug 15 2002;169(4):1887-1892.
98. Bacher P, Schink C, Teutschbein J, et al. Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. *J Immunol*. Apr 15 2013;190(8):3967-3976.
99. Olson MR, Russ BE, Doherty PC, Turner SJ. The role of epigenetics in the acquisition and maintenance of effector function in virus-specific CD8 T cells. *IUBMB Life*. Jul 2010;62(7):519-526.

100. Davison AJ, Dolan A, Akter P, et al. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol.* Jan 2003;84(Pt 1):17-28.
101. Avivi I, Stroopinsky D, Rowe JM, Katz T. A subset of CD8+ T cells acquiring selective suppressive properties may play a role in GvHD management. *Transpl Immunol.* Jan 2013;28(1):57-61.
102. Jin X, Demoitie MA, Donahoe SM, et al. High frequency of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-effector cells in HLA-A*0201-positive subjects during multiple viral coinfections. *J Infect Dis.* Jan 2000;181(1):165-175.
103. Hassan-Walker AF, Vargas Cuero AL, Mattes FM, et al. CD8+ cytotoxic lymphocyte responses against cytomegalovirus after liver transplantation: correlation with time from transplant to receipt of tacrolimus. *J Infect Dis.* Mar 15 2001;183(6):835-843.
104. von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* Mar 2003;3(3):223-232.
105. Moss P, Khan N. CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol.* May 2004;65(5):456-464.
106. Gyulai Z, Endresz V, Burian K, et al. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis.* May 2000;181(5):1537-1546.
107. Plotz PH. The autoantibody repertoire: searching for order. *Nat Rev Immunol.* Jan 2003;3(1):73-78.
108. Doherty JE, Huye LE, Yusa K, Zhou L, Craig NL, Wilson MH. Hyperactive piggyBac Gene Transfer in Human Cells and In Vivo. *Hum Gene Ther.* Mar 2012;23(3):311-320.
109. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J.* May 1 2012;443(3):603-618.
110. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell.* Jun 5 2014;157(6):1262-1278.
111. Zhang GX, Ma CG, Xiao BG, Bakhiet M, Link H, Olsson T. Depletion of CD8+ T cells suppresses the development of experimental autoimmune myasthenia gravis in Lewis rats. *Eur J Immunol.* May 1995;25(5):1191-1198.
112. Reynolds J, Norgan VA, Bhambra U, Smith J, Cook HT, Pusey CD. Anti-CD8 monoclonal antibody therapy is effective in the prevention and treatment of experimental autoimmune glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* Feb 2002;13(2):359-369.
113. Gravano DM, Hoyer KK. Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells. *J Autoimmun.* Sep 2013;45:68-79.
114. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med.* Dec 8 2011;365(23):2188-2197.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Thomas Buttgerit, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Etablierung von APC-Zelllinien zur Identifikation potentieller Autoantigene von CD8+ T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen am Beispiel der Psoriasis vulgaris“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

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

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Andreas Thiel für die Betreuung dieser experimentell-wissenschaftlichen Promotion bedanken. Als Mitglied seiner internationalen Arbeitsgruppe im BCRT konnte ich nicht nur grundlegende Fertigkeiten in der experimentellen Laborforschung erlernen, sondern auch tiefere Einblicke in die Grundlagenforschung über T-Zellen gewinnen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei dem eigentlichen Ideengeber für dieses Projekt und somit meiner Hauptansprechperson während der Laborexperimente im BCRT: Dr. rer. nat. Ulrik Stervbo. Durch seine lange Laborerfahrung, Geduld in der Einarbeitungsphase, problemlose Erreichbarkeit und klugen Hilfestellungen bei schwierigen experimentellen Schritten fühlte ich mich jederzeit gut betreut.

Ein ganz spezieller Dank geht an Dr. med. Paula Hoff, Dr. Cindy Strehl und Manuela Jakstadt, die mich bei der Weiterarbeit an dieser Forschungsarbeit unterstützten. Insbesondere für ihre unermüdliche Mitarbeit bei komplizierten Einstellungen am Durchflusszytometer möchte ich mich an dieser Stelle nochmals bei Dr. med. Paula Hoff bedanken.

Bei meinen Kollegen Dr. rer. nat. Sarah Meier, Kerstin Hoffmann und Dimas Abdirama möchte ich mich herzlich für die moralische Unterstützung während der Klonierungsexperimente und der Einarbeitungsphase am Durchflusszytometer bedanken.

Weiterhin danke ich den Psoriasis-Patienten und den anderen Probanden, die mir durch ihre Blutspende die Durchführung der Stimulationsexperimente für diese Arbeit ermöglichten.

Schließlich möchte ich mich sehr herzlich bei meinen lieben Eltern, meinen beiden lieben Großeltern und bei meiner lieben Freundin bedanken, die mich während der gesamten Zeit unterstützen und durch alle Höhen und Tiefen der Laborexperimente seelisch begleiteten. Bei dieser Gelegenheit möchte ich mich nochmals insbesondere bei meiner Mutter bedanken, die als Hautärztin insgesamt 15 aufgeschlossene Psoriasis-Patienten in ihrer Praxis zu einer Blutabnahme „im Dienste der Wissenschaft“ bewegen konnte.