

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Charakterisierung des Toleranz-assoziierten Gens
TOAG-1

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathrin Keeren

aus Hennigsdorf

Gutachter: 1. Prof. Dr. med H.-D. Volk
2. Prof. Dr. B. Arnold
3. Prof. Dr. med. W. Sterry

Datum der Promotion: 22.02.2010

Abkürzungen

AICD	Activation induced cell death, Aktivierungs-induzierter Zelltod
Apaf-1	Apoptotische Protease-aktivierender Faktor 1
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve, Fläche unter der Kurve
Bcl2	B-Zell-Lymphom 2
BH3	Bcl2 Homologa 3
Bid	BH3-Interacting domain death agonist
BSA	Body surface area, Körperoberfläche
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungscluster
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cFlip	FLICE inhibitorisches Protein
CLA	Kutanes Lymphozyt assoziiertes Antigen
cpm	Counts per Minute
CT	Threshold Cycle
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyt assoziiertes Antigen-4
CTLC	Kutanes T-Zell-Lymphom
Cy5	Cyanin 5
CyA	Cyclosporin A
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelt negativer Thymozyt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DP	Doppelt positiver Thymozyt
DTT	Dithioerythrol
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EMEA	Europäische Arzneimittel-Zulassungsbehörde
FAAD	Fas-associating protein with death domain
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fas	CD95
FasL	Fas-Ligand
Fc γ RIII	Fc gamma Rezeptor 3 (= CD16)
FDA	Food & Drug Administration (US-Arzneimittel-Zulassungsbehörde)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FL-1	Fluoreszenz-1 (Grünfluoreszenz)
FL-2	Fluoreszenz-2 (Rotfluoreszenz)
FLICE	FADD-like IL-1 β -converting enzyme
FSC	Vorwärtsstreulicht (für Zellgröße)
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Macrophagen Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus Host Disease, Transplantat-Wirt-Reaktion
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase

HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
i.m.	Intramuskulär
IAS	Inhibitorisches Apoptose Proteine
ICAM-1	Interzelluläres Adhesion Molekül-1
IFN γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	Internen Ribosomenstartstelle
LFA	Lymphozyten Function-Assoziiertes Antigen
MACS	Magnetische Zellsortierung
mAK	Monoklonaler-Antikörper
MHC	Major Histocompatibilitäts Komplex
MLC	Gemischte Lymphozyten-Kultur
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBMC	Periphere Blutmononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed Death-1
PDL-1	Programmed Death Ligand-1
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PLASI	Psoriasis log-basierter Area and Severity Index
PTK	Protein-Tyrosinkinase
PTP	Permeabilitäts-Transitions-Pore
pT α	Prä-alpha Kette des T-Zellrezeptors
PUVA	Psoralen plus UV-A
p-Wert	Statistisches Signifikanz Level
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
RHAMM	Rezeptor für Hyaluronan vermittelte Migration (= CD168)
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristic
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAPASI	Selbst-administrierter PASI
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SP	Single (einfach) positiver Thymozyt
SSC	Seitwärts-Streulicht (für Granularität)
tBid	Truncated (verkürztes) Bid
TGF β	Transforming Growth Factor-beta, Wachstumsfaktor
Th-Zelle	T-Helferzelle
TMRM	Tetramethylrhodamine Methyl Ester
TNF α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TOAG-1	Toleranz-assoziertes Gen-1
Treg-Zelle	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
VCAM-1	Vasculäres Zell-Adhäsions-Molekül-1
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Antigenerkennung durch T-Zellen.....	1
1.1.1	T-Zell-Entwicklung.....	1
1.1.2	T-Zell-Aktivierung.....	3
1.1.3	T-Zell-Apoptose.....	7
1.2	Biologika.....	8
1.2.1	Biologika im Überblick.....	9
1.2.2	Alefacept.....	11
1.3	Biomarker	13
1.3.1	TOAG-1	13
1.3.2	RHAMM.....	15
1.4	Psoriasis vulgaris	16
1.4.1	Epidemiologie	16
1.4.2	Pathogenese der Psoriasis.....	17
1.4.3	Evaluation des Schweregrades.....	19
1.4.4	Konventionelle Therapien der Psoriasis	20
2	ZIELSTELLUNG	22
3	MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1	Material.....	23
3.1.1	Chemikalien.....	23
3.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	23
3.1.3	Versuchssysteme (Kits).....	24
3.1.4	Antikörper und Farbstoffe	24
3.1.5	Bakterien und Mäusestämme sowie Zelllinien	25
3.1.6	Puffer und Medien	25
3.1.7	Primer und Sonden für quantitative real time PCR	26
3.2	Methoden.....	26
3.2.1	Klonierung der kodierenden Sequenz des murinen TOAG-1.....	26
3.2.1.1	Flankierung und Vervielfältigen des kodierenden Bereichs von TOAG-1.....	26
3.2.1.2	Aufreinigung des PCR Produktes mittels Gelextraktion	27
3.2.1.3	Ligation von TOAG-1 in den pDrive Klonierungsvektor.....	28
3.2.1.4	Transformation von E. coli	28
3.2.1.5	DNS-Präparation und Kontrolle des Inserts	29
3.2.1.6	Konstruktion eines Fusionsproteins aus TOAG-1 und EGFP	29
3.2.1.7	Klonierung von TOAG-1 in einen retroviralen Vektor	30
3.2.2	Lokalisation von TOAG-1 durch Transfektion von NIH-3T3-Zellen	30
3.2.2.1	Transiente Transfektion mit Roti-fect	30
3.2.2.2	Färbung der Mitochondrien	31
3.2.2.3	Färbung der Lysosomen	31
3.2.3	Retroviraler Gentransfer von TOAG-1 in primäre, murine CD4 ⁺ T-Zellen	31
3.2.3.1	Produktion eines TOAG-1 Retrovirus	31
3.2.3.2	Bestimmung der GFP Transduktionseffizienz eines Virusstocks.....	32
3.2.3.3	Gewinnung der Zellpopulationen	33
3.2.3.4	Stimulation der murinen T-Zellen	33
3.2.3.5	Retrovirale Transduktion.....	34
3.2.4	Immunomodulation mit Alefacept <i>in vitro</i>	34
3.2.4.1	Stimulation von humanen T-Zellen.....	34
3.2.5	Alefacept Studie an Psoriasis Patienten	35
3.2.5.1	Studienkonzept	35

3.2.5.2	Probenaufbereitung.....	35
3.2.6	Genexpressionsanalyse mit qRT-PCR (TaqMan®-Technologie)	35
3.2.7	Proliferationsassay	36
3.2.8	Durchflusszytometrie.....	36
3.2.8.1	Detektion von Zelloberflächenmolekülen	36
3.2.8.2	Detektion des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und des Anteils apoptotischer Zellen.....	36
3.2.8.3	Zytokinproduktion in Zellkulturüberständen.....	37
3.2.9	Statistik	37
4	ERGEBNISSE	39
4.1	Funktionelle Charakterisierung von TOAG-1.....	39
4.1.1	Lokalisation von TOAG-1 in NIH-3T3-Zellen	39
4.1.2	Einfluss von Immunmodulation auf die TOAG-1-Transkription und das mitochondriale Membranpotential <i>in vitro</i>	42
4.1.2.1	Transkriptionelle Regulierung von TOAG-1.....	42
4.1.2.2	Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)	43
4.1.3	Überexpression von TOAG-1 mittels retroviralem Gentransfer	44
4.1.3.1	Herstellung der TOAG-1-Viruspartikel und Kontrolle ihre Infektiösität	44
4.1.3.2	Transduktionseffizienz von primären murinen CD4 ⁺ T-Zellen	46
4.1.3.3	Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)	46
4.1.3.4	Programmierter Zelltod (Apoptose)	47
4.1.3.5	Zytokinfreisetzung	48
4.2	Immunomodulation mit Alefacept <i>in vitro</i>	50
4.2.1	Einfluss von Alefacept auf die Proliferation von humanen PBMCs.....	50
4.2.2	Transkriptionelle Regulation nach Alefacept Behandlung <i>in vitro</i>	51
4.2.3	Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)	54
4.2.4	Programmierter Zelltod (Apoptose).....	56
4.2.5	Wirkung von Alefacept in Abwesenheit Antigen-präsentierender Zellen (APZ).....	58
4.2.6	Einfluss von Alefacept auf PD-L1.....	60
4.3	Alefacept Studie an Psoriasis-Patienten	62
4.3.1	Therapieerfolg der Alefacept-Studie	62
4.3.2	Auswirkungen der Alefacept-Therapie auf Subpopulationen von T-Zellen.....	64
4.3.3	Transkriptionelle Regulation von TOAG-1 und RHAMM unter Alefacept-Therapie.....	65
4.3.4	Regulation anderer relevanter Gene unter Alefacept-Therapie	68
5	DISKUSSION	70
5.1	Funktionelle Charakterisierung von TOAG-1.....	71
5.2	Immunomodulation mit Alefacept <i>in vitro</i>	76
5.3	Alefacept-Studie an Psoriasis-Patienten	84
5.4	Ausblick	90
6	ZUSAMMENFASSUNG	92
	SCHRIFTENVERZEICHNIS.....	94
	DANKSAGUNG.....	102
	LEBENS LAUF.....	103

PUBLIKATIONSLISTE 104

ERKLÄRUNG 105

1 Einleitung

Die Suche nach geeigneten Biomarkern, die normale oder pathologische biologische Prozesse charakterisieren gewinnt immer stärker an Bedeutung in der medizinischen Forschung. Neben Therapiemonitoring werden Biomarker zur Diagnose oder prädiktiv für den Verlauf einer Erkrankung eingesetzt. Konventionell gemessene Blutparameter werden durch sie ergänzt und zugrunde liegende Wirkmechanismen von Medikamenten werden klarer. In der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und zur Vermeidung von Transplantatabstoßungen setzt man heute auf die gezielte Beeinflussung des Immunsystems, der Immunmodulation. Hierbei ist es wichtig das empfindliche Gleichgewicht zwischen funktioneller Immunabwehr und unerwünschter Reaktion auf ein Fremdorgan oder körpereigene Substanzen zu Gunsten des Patienten einzustellen. Denn das Immunsystem soll den eigenen Organismus weiterhin vor körperfremden Substanzen, wie Toxinen und infektiösen Krankheitserregern aber auch vor körpereigenen Zellen, die Defekte in der Proliferation aufweisen und somit zur Tumorbildung befähigt sind, schützen. Andererseits soll es ein Fremdorgan oder harmlose, körpereigene Proteine tolerieren.

Jedoch sprechen nicht alle Patienten mit dem gleichen Erfolg auf eine immunmodulatorische Therapie an. Deshalb ist es von hohem Interesse den Therapieverlauf mit der zusätzlichen Hilfe von Biomarkern individuell zu überwachen. Somit kann auf Veränderungen schneller reagiert und gegebenenfalls eine andere therapeutische Maßnahme ergriffen werden.

1.1 Die Antigenerkennung durch T-Zellen

Das Immunsystem kann unterschiedlich auf Pathogene reagieren. Die angeborene Immunreaktion („innate immunity“) ist unspezifisch aber schnell. Die erworbene Immunreaktion („adoptive immunity“) ist spezifisch gegen pathogene Antigene gerichtet, benötigt aber länger, um aktiviert zu werden. Antigene können zum einen extrazelluläre fremde Peptide sein, z.B. Bakterien oder bakterielle Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wie Makrophagen oder unreifen Dendritischen Zellen aufgenommen wurden. Zum anderen können diese Antigene auch körpereigene Peptide sein, die durch Phagozytose abgestorbener Zellen entstanden sind. Welche Antigene körpereigen und welche körperfremd sind, „lernen“ Lymphozytenpopulationen in ihrer Entwicklung zur Erlangung von Selbsttoleranz.

1.1.1 T-Zell-Entwicklung

T-Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) des Knochenmarks. Sie reifen im Thymus und in den sekundären lymphatischen Organen zu funktionellen T-

Lymphozyten. Dabei durchlaufen sie drei wesentliche Stadien der Differenzierung und Selektion, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Zu Beginn exprimieren Thymozyten weder einen vollständigen T-Zellrezeptor Komplex, noch die Oberflächenantigene (Cluster of Differentiation, CD) CD4 oder CD8 und werden somit als doppelt-negativ (DN) bezeichnet. In dieser Phase entwickelt sich der T-Zellrezeptor (TZR), durch den die vollständig gereifte T-Zelle später ihr spezifisches Antigen erkennt. Der TZR besteht aus einer konstanten und einer variablen Region.

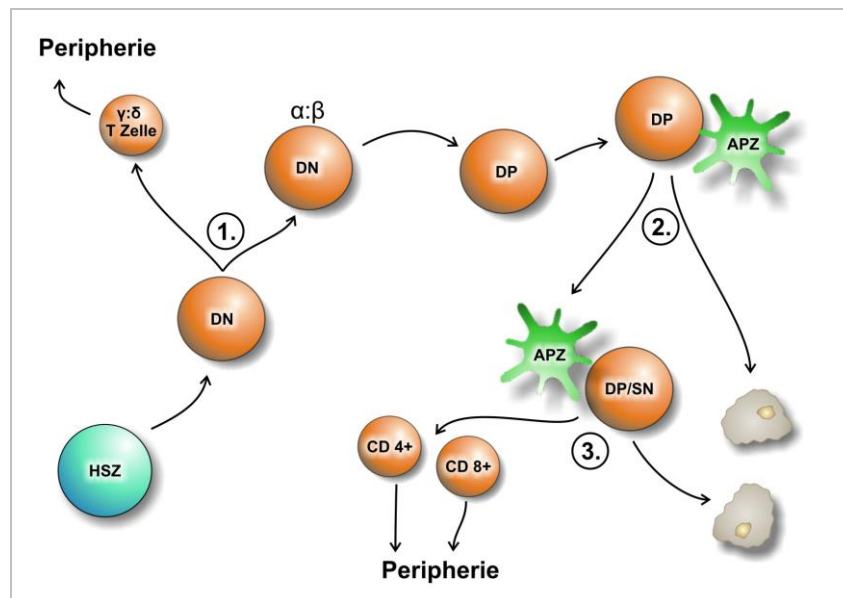


Abbildung 1: Schema der T-Zellentwicklung im Thymus.

Modifiziert nach Germain (1). 1. Signal zur Entwicklung von $\gamma:\delta$ TZR oder $\alpha:\beta$ TZR. 2: positive Selektion. 3: negative Selektion. HSZ: Hämatopoetische Stammzelle; DN: doppelt negativer Thymozyt ($CD4^-/CD8^-$); DP: doppelt positiver Thymozyt ($CD4^+/CD8^+$); grüne Zellen stellen APZ (Epithel bzw. Dendritische Zellen) dar und deformierte graue Zellen symbolisieren apoptotische Zellen.

Der DN Thymozyt exprimiert anfangs zwei TZR auf seiner Oberfläche: den $\gamma:\delta$ TZR und den prä TZR, bestehend aus einer TZR β -Kette und einer prä α -Kette (pT α). Die Gene für die β , γ und δ Ketten werden in dieser Phase ständig umgelagert (= rearrangement), um ein höchstes Maß an Vielfalt des TZR zu erreichen. Welchen TZR der Thymozyt entwickelt, hängt davon ab, über welchen der beiden TZR er ein Signal erhält. Wird das Signal über den $\gamma:\delta$ TZR empfangen, so reift der Thymozyt zur $\gamma:\delta$ T-Zelle heran, die in die Peripherie wandert. Sehr viel häufiger wird dieses Signal jedoch über den prä TZR empfangen woraufhin der Thymozyt einen $\alpha:\beta$ TZR entwickelt und im Thymus in das „Doppelt Positive“ (DP) Stadium übergeht, in dem er sowohl CD8 als auch CD4 exprimiert. Im Gegensatz zu B-Zellen, können T-Zellen Antigene nicht direkt erkennen. Daher werden sie ihnen durch APZ über die so genannten Major Histocompatibility Complexes (Haupthistokompatibilitätskomplexe, MHC-I und-II) als Peptid dargeboten. Diese Fähigkeit erlangen DP Thymozyten während ihrer Reifung in der positiven thymischen

Selektion. Hierzu werden ihnen Selbst-Peptide auf MHC I und II von Epithelzellen dargeboten. Erkennt der TZR den Selbst-Peptid/MHC-Komplex mit angemessener Affinität, so kann seine Entwicklung fortfahren und die Expression dieses TZR wird gesteigert. Thymozyten, deren Affinität zum Selbst-Peptid/MHC-Komplex zu gering ist, erfahren den programmierten Zelltod (Apoptose). Zusätzlich wird der Thymozyt auch einer negativen thymischen Selektion unterzogen. Hier werden diejenigen Thymozyten deletiert, die Selbst-Antigene mit zu hoher Affinität erkennen und somit unangemessen auf körpereigene Peptide reagieren. Es folgt die Reifung zum einfach-positiven Thymozyten (single positive, SP), der entweder CD4 oder CD8 auf der Oberfläche trägt. Anschließend wandern die Thymozyten in die sekundären lymphatischen Organe auf der Suche nach APZ, dessen präsentiertes Peptid sie, in Verbindung mit einem MHC-Komplex, erkennen.

1.1.2 T-Zell-Aktivierung

Die T-Zellaktivierung ist im Wesentlichen von zwei Signalen abhängig. Das erste Signal wird der T-Zelle über die Bindung ihres T-Zellrezeptors an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) vermittelt. Man unterscheidet zwei Klassen der MHC: MHC Klasse I- (Mensch = HLA-A, -B, -C) und MHC Klasse II Moleküle (Mensch = HLA-DR, -DP, -DQ). Fast alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC Klasse I, wenngleich das Ausmaß der Expression zwischen verschiedenen Zelltypen variiert. Sie präsentieren intrazelluläre Peptide aber auch pathogene Peptide, die beispielsweise durch eine Infektion in die Zelle gelangt sind. Dieser MHC I/ Peptid-Komplex wird vom TZR zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen erkannt und gebunden. MHC II-Moleküle werden von APZ des Immunsystems exprimiert. Zu ihnen zählen B-Zellen, Dendritischen Zellen (DZ), Makrophagen/Monozyten und Langerhans-Zellen aber auch aktivierte T-Lymphozyten, Endothelzellen und Keratinozyten. MHC II Moleküle präsentieren extrazelluläre Peptide und sind in der Lage, als MHC II/ Peptid-Komplexe CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren. Darüber hinaus können extrazelluläre Peptide auch von MHC I Molekülen präsentiert werden. Dies wurde vor allem für Dendritische Zellen beschrieben (2). Diese Kreuzpräsentation („cross-presentation“) hat zur Folge, dass sowohl CD4⁺ als auch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen auf extrazelluläre Antigene reagieren können (3). Die Bindung des MHC/ Peptid Komplex der APZ und des TZR der T-Zelle wird durch die Oberflächenmoleküle CD4 bzw. CD8 stabilisiert und stellt das erste Signal der T-Zellaktivierung dar. Dieses eine Signal ist jedoch nicht ausreichend, um naive T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu Effektor-T-Zellen anzuregen. Für die antigenspezifische klonale Vermehrung naiver T-Zellen ist zusätzlich ein zweites, so genanntes ko-stimulatorisches Signal, erforderlich. Dieses wird

ebenfalls von der bereits über den TZR gebundenen APZ ausgesandt. Bleibt dieses zweite Signal aus, so führt das zur Reaktionsunfähigkeit der T-Zelle, auch Anergie genannt, oder zur Apoptose.

Die am besten charakterisierten ko-stimulatorischen Moleküle sind die Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die auf der Oberfläche von APZ exprimiert werden. Ihr Ligand, das Molekül CD28, befindet sich auf der T-Zelle. Eine Bindung von CD28 an die B7-Moleküle bewirkt nach erfolgter TZR Erkennung eine Ko-Stimulation mit anschließender klonaler Vermehrung der naiven T-Zelle mit identischen TZR. Darüber hinaus wird die nun aktivierte T-Zelle zur Expression verschiedenster Proteine angeregt. Dazu gehört der induzierbare CD40-Ligand (CD40L bzw. CD154), der CD40 auf der APZ bindet und somit weitere Aktivierungssignale an die T-Zelle übermittelt. Die Bindung von CD58 (LFA-3 = lymphocyte function-associated antigen 3) an CD2 initiiert eine starke wenn auch antigenunabhängige Zelladhäsion und induziert die Ausschüttung großer Mengen von Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) in Gedächtnis T-Zellen („memory“ T-Zellen) (4). Auch die Interaktion von CD54 (ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule 1) auf APZ mit CD11a (LFA-1 = lymphocyte function-associated antigen 1) der T-Zelle spielt eine entscheidende Rolle bei der Ko-Stimulation. Diese verschiedenen Wechselwirkungen führen zur Produktion von Zytokinen, die zur Proliferation anregen und über die weitere Differenzierung der T-Zelle zur Effektor-T-Zelle entscheiden. Dabei spielt das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) eine besondere Rolle. Ruhende T-Zellen exprimieren nur die β - und die γ -Kette des IL-2 Rezeptors, der deshalb nur eine schwache Affinität zu seinem Bindungspartner IL-2 aufweist. Wird die T-Zelle über die beiden Signale aktiviert, so wird die Expression der α -Kette (= CD25) des IL-2 Rezeptors induziert und die Affinität zu IL-2 drastisch gesteigert. Somit bindet die aktivierte T-Zelle weitaus mehr IL-2 und wird angeregt in den Zellzyklus einzutreten und zu proliferieren (klonale Expansion). Diese unreife Effektor-T-Zelle (Th0) kann nun in Anwesenheit des Antigens auch ohne die Bindung ko-stimulatorischer Moleküle aktiviert werden und sich weiter differenzieren. Dieser Prozess ist stark von dem vorherrschenden Zytokinmuster abhängig. Die Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und IL-12 beispielsweise sind eng assoziiert mit der Ausbildung von Effektor-T-Zellen des Typs 1 (Th1), der pro-inflammatorischen Abwehr von intrazellulären Pathogenen. Die Th1 Effektor-T-Zellen sezernieren ihrerseits spezielle Zytokine ($\text{IFN}\gamma$ ect.) und exprimieren charakteristische Oberflächenmoleküle, die B-Zellen zur Bildung opsonierender Antikörper (Mensch = IgG1, IgG3) anregen und so das Komplementsystem aktivieren. Darüber hinaus phagozytieren Makrophagen im Anschluss an die Bindung einer Th1 Effektor-T-Zelle effektiver. Zytokine wie IL-4 und IL-5 sind dagegen verknüpft mit der Differenzierung zu Th2 Effektor-T-Zellen. Sie

werden als anti-inflammatorisch bezeichnet und verursachen die Differenzierung von B-Zellen und veranlassen sie zur Bildung von Immunglobulinen aller Klassen, u.a. IgM. Diese Vielfalt an Immunglobulinen stellen die Effektormoleküle der humoralen Immunantwort dar. In den letzten Jahren kamen zwei weitere Effektor-T-Zelltypen zu diesem Modell von Th1 und Th2 hinzu. Dabei handelt es sich um T-Helferzellen des Typs 17, die vermehrt das namensgebende IL-17 sezernieren und deren Entwicklung durch die Anwesenheit von IL-6, IL-23 und TGFβ begünstigt wird. Ihre Funktion ist noch nicht endgültig geklärt, sie scheinen jedoch bei der Immunantwort gegen Pilzinfektionen und extrazellulären Bakterien entscheidend zu sein (5, 6). Neuere Erkenntnisse schreiben Th17 Effektor-T-Zellen eine maßgebliche Beteiligung bei der Entwicklung der Psoriasis und anderen allergischer Störungen zu (7, 8). Darüber hinaus kann die Anwesenheit von IL-10 und TGFβ die Differenzierung von aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (Treg) anregen. Ihr Name leitet sich aus ihrer Funktion ab, die Immunantwort zu regulieren. Ihre An- bzw. Abwesenheit spielt somit eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Bekämpfung von Autoimmunität und Tumoren, aber auch bei der Entwicklung von Toleranz gegenüber einem lebensrettenden Fremdorgan (9-11). In Abbildung 2 sind einige, für die T-Zellaktivierung essentielle Interaktionen (Signal 1 und 2) zwischen APZ und T-Zelle sowie die anschließende Differenzierung einer naiven CD4⁺ T-Zelle schematisch zusammengefasst.

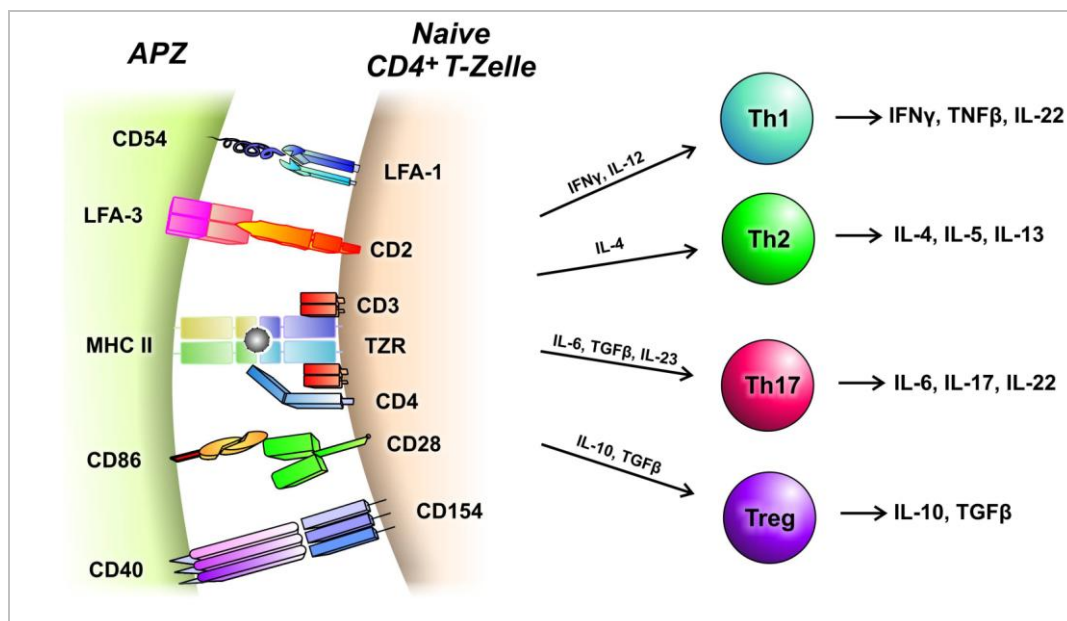


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung einer naiven CD4⁺ T-Zelle durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APZ) und Differenzierung der T-Zelle durch bestimmte Zytokinmuster. Modifiziert nach Sabat *et al.* (12):

Die Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen unterscheidet sich im Wesentlichen nicht von der Aktivierung CD4 positiver T-Zellen, ist jedoch einiges umfangreicher. CD8⁺ T-Zellen erkennen

nur MHC I gebundenes Peptid. Dabei handelt es sich meist um Viruspartikel. Die Effektorfunktion von aktivierten $CD8^+$ T-Zellen ist derart stark, dass sie ein höheres Maß an Ko-Stimulation benötigen, um aktiviert zu werden, als $CD4^+$ T-Zellen. Dies kann beispielsweise durch professionelle APZ, wie reife DZ, erfolgen. Sie tragen ein hohes Repertoire an ko-stimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche und sind daher in der Lage, $CD8^+$ T-Zellen direkt zu aktivieren. Die $CD8^+$ T-Zellen produzieren anschließend IL-2 und induzieren somit ihre eigene Proliferation. Ist jedoch keine reife DZ vor Ort, so muss eine bereits aktivierte $CD4^+$ Effektor-T-Zelle dieselbe APZ erkennen, wie die zu aktivierende $CD8^+$ T-Zelle. Erst die Bindung der aktivierten $CD4^+$ Effektor-T-Zelle gibt der APZ das Signal zur Expression der ko-stimulatorischen Moleküle, die zur Aktivierung und Proliferation der $CD8^+$ T-Zelle notwendig sind. Erkennt diese $CD8^+$ T-Zelle ihr spezifisches Antigen präsentiert durch MHC I, so induziert sie, durch Expression von Fas-Liganden oder durch Ausschüttung von zytotoxischen Molekülen, wie Granzym B und Perforin, Apoptose in der Zielzelle (13). Auch die zytotoxische Immunantwort ist geprägt durch Zytokine. So sezernieren $CD8^+$ -Effektor-T-Zellen ein hohes Maß an $IFN\gamma$, welches die Replikation von Viren hemmt (14). Ein Teil der so aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen entwickelt sich in Anwesenheit von IL-7 und IL-15 zu memory T-Zellen. Sie sind durch bestimmte Oberflächenmoleküle ($CD45RO$, $CD2^{++}$) gekennzeichnet. Diese memory T-Zellen können über Jahre in der Peripherie zirkulieren und bei erneutem Kontakt mit dem spezifischen Antigen schneller eine effektive Immunantwort auslösen (15).

Es gibt jedoch auch negative ko-stimulatorische Moleküle (16), die sowohl auf $CD4^+$ T-Zellen als auch auf $CD8^+$ T-Zellen wirken. Aktivierte T-Zellen exprimieren beispielweise verstärkt CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen-4), das homolog zum CD28 ist, aber eine ca. 20fach höhere Bindungsaffinität für B7-Moleküle besitzt als CD28. CTLA-4 sendet den aktivierten T-Zellen inhibitorische Signale, um die Regulation autokriner T-Zellklone zu kontrollieren oder um eine Hyperaktivierung abzuwehren. Ein weiteres Beispiel für eine negative Regulation ist die PD-1 (Programmed Death-1) PD-Ligand (1 bzw. 2) Ko-Stimulation (17-19). Generell sind negative Signale dadurch gekennzeichnet, dass sie T-Zellen in den nicht reaktiven Zustand der Anergie, versetzen können. Hierzu wird die Proliferation und die Zytokinproduktion inhibiert und somit der sich selbst verstärkende Prozess der T-Zellaktivierung unterbrochen. Darüber hinaus können negative ko-stimulatorische Signale auch den programmierten Zelltod, die Apoptose, induzieren (20). Die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden ko-stimulatorischen Signalen ist somit entscheidend für ein kompetentes Immunsystem. Die gezielte Beeinflussung dieses Gleichgewichts stellt einen therapeutischen

Ansatz zur Vermeidung von Organabstoßungen oder zur Behandlung von Tumoren und Autoimmunerkrankungen dar.

1.1.3 T-Zell-Apoptose

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist die meist untersuchte Form von Zellsterben. Im Wesentlichen unterscheidet man zwei Signalwege zur Induktion von Apoptose, den intrinsischen (mitochondrialen) – und den extrinsischen bzw. Rezeptor-vermittelten Weg (= “death receptor pathway“). Eine schematische Darstellung beider Wege ist in Abbildung 3 gezeigt. Die Apoptose spielt eine zentrale Rolle bei der Immunantwort. Wie schon in Kapitel 1.1.1 erwähnt, ist die Apoptose bereits an der T-Zellentwicklung beteiligt. Während einer unspezifischen Immunreaktion (angeborene Fähigkeit) kann somit eine infizierte Zelle getötet werden, um deren intrazelluläre Pathogene zu eliminieren.

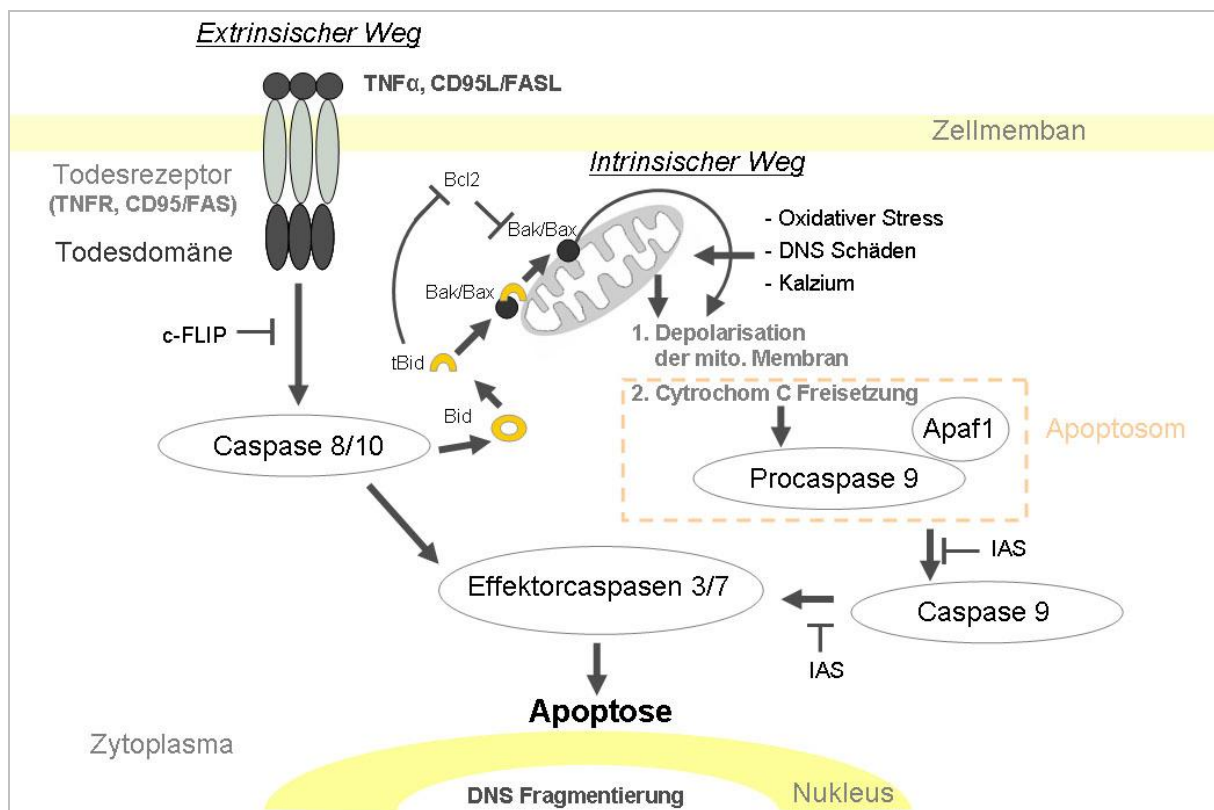


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Intrinsischen und Extrinsischen Kaskade der Apoptose (21, 22)
Extrinsischer Weg: Es kommt zur Bindung des Todesrezeptors (z.B. TNF α -Rezeptor bzw. CD95) an seinen Liganden (z.B. TNF α bzw. CD95L). Die Todesdomäne oligomerisiert und aktiviert die Caspasen 8 und 10, die zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 führen. *Intrinsischer Weg:* Oxidativer Stress, Kalziumüberschuss und Schäden an der DNS führen zur Änderung des Membranpotentials der Mitochondrien und somit zur Ausschüttung von Cytochrom c ins Zytoplasma. Zusätzlich bindet der apoptotische Protease-aktivierende Faktor 1 (Apaf1) an Procaspase 9. Gemeinsam bilden sie das Apoptosom, welches die Caspase 9 aktiviert und so ebenfalls zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 führt. Inhibitorische Signale gehen vom zellulären FLICE inhibitorischen Protein (c-FLIP) und den inhibitorischen Apoptose Proteinen (IAS) aus. Beide Signalwege können über das BH3-only Protein Bid (23) und seiner durch Proteolyse von Caspase 8 verkürzten Form, tBid, verknüpft werden. Dadurch wird der Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg verstärkt.

Aber auch die Pathogene selbst, zumeist Viren, können Apoptose einer infizierten Zelle induzieren, um ihre eigene Verbreitung zu sichern. Reagiert das Immunsystem spezifisch (erworbene Fähigkeit) auf ein Pathogen, so kommt es zur klonalen Expansion spezifischer T-Zellen (siehe 1.1.2). Reduziert sich der pathogene Organismus nach erfolgreicher Immunabwehr, so erfahren die überschüssigen aktivierten T-Zellen den programmierten Zelltod, um eine übermäßige Immunreaktion zu vermeiden und nur eine kleine Anzahl memory T-Zellen zurück zu lassen. Dieser Aktivierungs-induzierte Zelltod (AICD = activation induced cell death) wird über den Todesrezeptor vermittelt. Während der mitochondrial-vermittelten Apoptose spielen die Mitglieder der Bcl2 Proteinfamilie, eine bedeutende Rolle. Diese nach dem B-Zell-Lymphom 2 benannte Proteinfamilie umfasst sowohl pro als auch anti-apoptotische Proteine, die vor allem an der Regulation der Aktivierung von Cystein-abhängigen, Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen) beteiligt sind, die letztendlich die Apoptose einer Zelle induzieren (siehe Abbildung 3). Die Bcl2 Homologa 3 (BH3) Proteine gehören zu den Bcl2 Proteinen. Dem mit BH3-interagierenden Bid (BH3-interacting domain death agonist) Protein kommt während der Apoptose eine besondere Bedeutung zu. Es verknüpft den Rezeptor-vermittelten Apoptose Weg mit der mitochondrialen Apoptose. Hierzu wird nach Formierung der Todesdomäne, zytosolisches Bid durch die Caspase 8 gespalten (24). Das Produkt wird tBid (= „truncated“ Bid) genannt und wird zur äußeren mitochondrialen Membran transloziert. Dort soll es entweder die pro-apoptotischen Proteine Bax oder Bak direkt aktivieren (25, 26) oder Bcl2 Proteine blockieren, die Bax und Bak inhibieren (27). Das Resultat ist jedoch nach beiden Theorien die Induktion des programmierten Zelltod über die Ausschüttung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium.

Eine fehlerhafte Regulation vor allem des AICD spielt eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, Tumoren oder Sepsis (28). Apoptose kann auch künstlich, beispielsweise durch UV oder γ -Strahlung und Medikamente, induziert werden. Apoptotische Zellen kapseln sich zunächst von ihrem Zellverband ab und zeigen eine Verdichtung des Chromatins und des Zytoplasmas als initial morphologisch sichtbare Veränderung. Die Plasmamembran bildet Blasen und apoptotische Körper, welche die verdichteten Chromatine und Zellorganellen enthalten. Die so veränderte Zelle wird durch Phagozytose eliminiert.

1.2 Biologika

Die Möglichkeit, Antikörper, Interleukine und Fusionsproteine molekularbiologisch zu modifizieren und biotechnologisch herzustellen, eröffnete neue Strategien in der Behandlung von Tumoren oder entzündlichen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn oder

Psoriasis. Diese biologischen Medikamente, sogenannte Biologika, greifen meist in die Kommunikation zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen ein. So können sie die Immunreaktion gezielt beeinflussen

Bereits in den achtziger Jahren wurde der erste Antikörper zur Therapie von akuten Abstoßungsreaktionen nach Nieren-, Herz- und Lebertransplantation eingesetzt (29). Dieser Antikörper ist ein, mittels Hybridomatechnik hergestellter, muriner anti-CD3-Antikörper namens Muronomab (OKT3). Bei der Hybridomatechnik werden Antikörper-produzierende B-Zellen von immunisierten Mäusen mit Tumorzellen fusioniert. Die Antikörper dieser gewonnenen Hybridomzellen werden auf ihre Spezifität getestet und die Zelle, deren Antikörper hoch spezifisch sind, wird isoliert. Sie produziert nach Affinitätsreifung immer die gleichen Antikörper (= monoklonale AK = mAK). Da es sich hierbei um Antikörper aus der Maus (-omab) handelt, werden im Menschen Anti-Antikörper gegen das murine Eiweiß gebildet wodurch ihre Wirksamkeit deutlich eingeschränkt wird. Um diese Immunogenität weitestgehend zu minimieren, wurden Antikörper von Primaten (-imab), chimäre (-ximab), humanisierte (-zumab) und humane (-umab) Antikörper entwickelt. Bei chimären Antikörpern besteht der konstante Teil aus humanem Immunglobulin (Fc) und nur die Antigen-bindenden Fragmente (fab) sind muriner Herkunft. Humanisierte Antikörper sind zum Großteil humane IgG, lediglich die Antigen-bindenden Paratope sind noch murine Peptidsequenzen. Antikörper, die ausschließlich humanen Ursprungs sind, werden meist mit der Phagen-Display Technologie hergestellt, da humane Hybridome nur schwer Antikörper produzieren. Für die Phagen-Display Technologie werden aus humanen Antikörper-produzierenden B-Zellen, die Antikörper kodierenden Gene isoliert, vervielfältigt und eine Gen-Bibliothek erstellt. Nach Klonierung in Phagemid-Vektoren erfolgt die Transformation in *E coli*. In der Folge entstehen rekombinante Phagen, die jeder ein unterschiedliches Antigen-bindendes Fragment (fab) der humanen Antikörper auf ihrer Oberfläche exprimieren. Im anschließenden Selektionsprozess („Panning“) werden die Phagen anhand des spezifischen Antigens isoliert. Sie enthalten die gesuchte kodierende DNS, die molekularbiologisch weiter vervielfältigt und für die Herstellung kompletter humaner Antikörper herangezogen wird.

1.2.1 Biologika im Überblick

Die Auswahl an Biologika ist in den letzten Jahren stark angestiegen und so auch die Vielfalt ihrer Angriffspunkte. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben, ist die Einleitung einer spezifischen Immunreaktion durch T-Zellen von mehreren Signalen abhängig. Diese Signale können mit den Biologika gezielt unterbrochen bzw. verstärkt werden, was den Verlauf der

Immunreaktion entscheidend mitbestimmt. OKT3 beispielsweise bindet an das Oberflächenmolekül CD3, welches dem T-Zellrezeptorkomplex angehört und blockiert somit das erste Signal der T-Zellaktivierung. Antikörper können jedoch auch das zweite Signal zur T-Zellaktivierung, die Ko-Stimulation blockieren und so Anergie oder Apoptose in T-Zellen induzieren. Auch negative Ko-stimulatorische Moleküle (z.B. CTLA-4) können gezielt stimuliert oder inflammatorische Zytokine (z.B. TNF α) abgefangen werden. Dazu werden Fusionsproteine aus humanem IgG und den jeweiligen Bindungspartnern hergestellt. In Tabelle 1 sind einige wichtige Biologika, ihre Wirkungsmechanismen und Anwendungsgebiete zusammengestellt.

Tabelle 1: Übersicht einiger Biologika, ihre Wirkung und Anwendung (30, 31).

Die aufgelisteten Medikamente befinden sich teilweise noch in klinischen Studien der Phasen 2 oder 3. Abkürzungen: GvHD: Transplantat-Wirt-Reaktion (=Graft versus Host Disease); SLE: Systemischer Lupus erythematodes, MS: Multiple Sklerose; CTCL: kutanes T-Zell-Lymphom.

Strategie	Substanz	Typ	Ziel	Anwendungsgebiete
<i>Hemmung der T-Zellaktivierung</i>	Alefacept (LFA3TIP)	humanes Fusionsprotein	Blockierung von CD2	Psoriasis, GvHD
	Abatacept (CTLA-4)	humanes Fusionsprotein	negative Ko-Stimulation	Psoriasis, Rheumatoide Arthritis
	IDEC131	humanisierter anti-CD40L-mAK	Blockierung von CD40	Psoriasis, SLE, MS
	Efalizumab	humanisierter anti-CD11a-mAK	Blockierung der T-Zell-Adhäsion	Psoriasis, Transplantation
<i>Eliminierung aktivierter T-Zellen</i>	OKT3	muriner anti-CD3-mAK	Blockierung des T-Zellrezeptorkomplex	Psoriasis, Transplantation
	Humax CD4	humaner anti-CD4-mAK	Blockierung des T-Zellrezeptorkomplex	Psoriasis, CTCL
	Daclizumab	humanisierter anti-CD25-mAK	Blockierung des IL-2 Rezeptors	Psoriasis, Transplantation MS
<i>Hemmung von Th1 Zytokinen</i>	Infliximab	chimärer anti-TNF α -mAK	Inaktivierung von TNF α	Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa
	Enbrel (Eternacept)	humanes Fusionsprotein	Inaktivierung von TNF α	Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Alzheimer
	Adalimumab (Humira)	Humaner anti-TNF α -mAK	Inaktivierung von TNF α	Psoriasis, Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn
	Fontolizumab	humanisierter anti-IFN γ -mAK	Inaktivierung von IFN γ	Psoriasis, Morbus Crohn
	Ustekinumab	humaner anti-p40 (IL-12, IL23) mAK	Inaktivierung von IL-12 und IL-23	Psoriasis
<i>Applikation von Th2 Zytokinen</i>	Tenovil (IL-10)	Rekombinant		Psoriasis, rezidiver Morbus Crohn
	Interleukin-4 (IL-4)	Rekombinant	Änderung des Zytokinprofils	Psoriasis
	Interleukin-11 (IL-11)	Rekombinant		Psoriasis

Die Wirksamkeit von Biologika ist insbesondere für die kurz und mittelfristige Behandlung (3-12 Monate) durch klinische Studien belegt (32). Jedoch sind sie aufgrund ihrer aufwendigen Herstellung sehr kostenintensiv (14.000-33.000 € pro Behandlungszyklus). Daher bleibt eine solche Behandlung meist Patienten vorbehalten, die entweder sehr schwer betroffen sind oder bereits mehrere konventionelle und systemische Therapien erfolglos durchlaufen haben. Das heißt, einer Therapie mit diesen Medikamenten muss eine genaue ökonomische Betrachtung für den Patienten vorausgehen. Darüber hinaus streut die Wirksamkeit dieser neuen biologischen Medikamentenklasse innerhalb der Patientengruppen. Daher wird zumeist eine „Mindestwirksamkeit“ definiert, welche eine erfolgreiche von einer unzureichenden Therapie unterscheidet. Diese Grenze wird häufig sehr hoch angesetzt, z.B. eine Symptomreduktion vom mindestens 75 %. Auch deshalb sind zuverlässige Prädiktoren oder Biomarker, die frühzeitig ein ausreichendes Ansprechen auf eine Therapie mit Biologika anzeigen, von großem Wert. Zusätzlich sind noch einige Fragestellungen, wie Langzeitwirksamkeit, Sicherheit und Nebenwirkungen unter Alltagsbedingungen, optimale behandlungsfreie Intervalle oder Nutzen und Wirksamkeit möglicher Kombinationstherapien, z.B. mit konventionellen systemischen Medikamenten, unzureichend untersucht.

1.2.2 Alefacept

Alefacept ist 2003 von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration) und in der Schweiz für die Behandlung von mittlerer bis schwerer Psoriasis zugelassen worden. Die Zulassung von der europäischen Zulassungsbehörde von Arzneimitteln, EMA ist noch nicht erfolgt. Die Psoriasis ist eine T-Zell-vermittelte Erkrankung, die sich hauptsächlich auf das Hautbild auswirkt und in Kapitel 1.4 eingehend beschrieben wird. Alefacept ist bisher auch erfolgreich zur Behandlung anderer T-Zell-vermittelter Störungen, wie Lichen planus oder der Transplantat-Wirt-Reaktion (GvHD), eingesetzt worden (33-35). Dieses Biologikum ist ein humanes Fusionsprotein bestehend aus dem Lymphozyten Funktions-assoziierten Antigen-3 (= LFA-3) und dem Fc-Fragment des humanen Immunglobulins 1 (= IgG1).

LFA-3 wird auf APZ exprimiert, die den TZR von T-Zellen über ihren MHC/Peptidkomplex binden können. Somit ist das erste Signal der T-Zellaktivierung gegeben (Kapitel 1.1.2). Die Bindung von LFA-3 an das, von T-Zellen exprimierte, CD2-Molekül gehört zu den kostimulatorischen, unter dem Signal 2 zusammengefassten, Interaktionen und ist ebenfalls essentiell für die T-Zellaktivierung. Ziel einer Therapie mit Alefacept ist unter anderem die Blockierung dieser Ko-Stimulation, wodurch die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen

unterbunden wird. Zusätzlich kann das Fc-Fragment von Alefacept von dem Fc γ Rezeptor 3 auf Natürlichen Killerzellen (NKZ) und Makrophagen gebunden werden. Dadurch wird Granzym B ausgeschüttet, welches in der Zielzelle Apoptose induziert. Die Struktur von Alefacept und die beiden Wirkmechanismen sind in Abbildung 4 veranschaulicht.

Das Oberflächenmolekül CD2 wird in besonders hoher Dichte auf aktivierten Memory T-Zellen exprimiert. Daher wird angenommen, dass Alefacept vornehmlich auf diese Zellen wirkt und ihre Anzahl reduziert (36, 37). Auch bei diesem Biologikum wird eine Symptomreduktion von 50 –75 % als Mindestanforderung für eine erfolgreiche Therapie definiert. Alefacept ist ein gut wirksames und darüber hinaus auch ein nebenwirkungsarmes Biologikum.

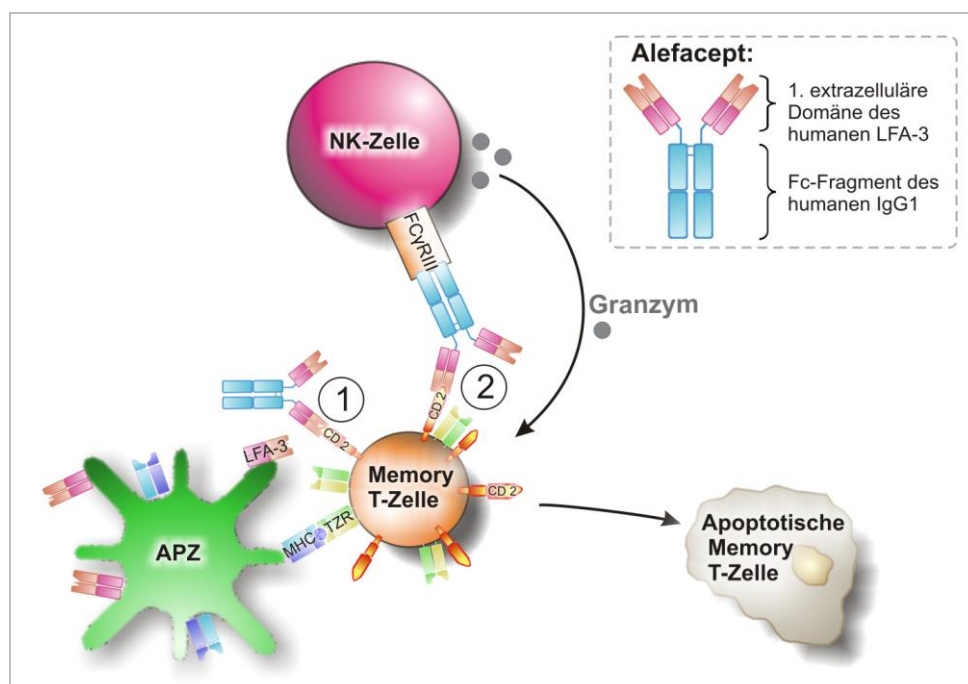


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur und beschriebene Wirkmechanismen von Alefacept (38, 39):

Im Fenster oben rechts ist der strukturelle Aufbau von Alefacept dargestellt: Es ist ein Fusionsprotein aus dem humanen Lymphozyten Funktions-assoziierten Antigen-3 (= LFA-3) und dem Fc-Fragment des humanen Immunglobulins 1 (IgG1). **1.** Blockade der Ko-Stimulation zwischen einer T-Zelle und einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) über ihr LFA-3 und CD2 (vermehrt von Memory T-Zellen exprimiert). Durch die ausbleibende Ko-Stimulation wird entweder Anergie oder Apoptose induziert. **2.** Bindung von Alefacept an CD2 und dem Immunglobulin (Fc γ)-Rezeptor 3 von Natürlichen Killerzellen (NKZ), die daraufhin zur Ausschüttung von Granzym B veranlasst werden und somit Apoptose der Memory T-Zelle bewirken.

In Phase 3 Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Psoriasis Symptome bei allen behandelten Patienten um 20 -90 % verringerten (40). Weiterhin konnten keine Unterschiede bezüglich Schwere und Häufigkeit von Nebenwirkungen zwischen der behandelten und der Placebo-Gruppe festgestellt werden (40). Erfolgreich therapierte Patienten zeigten noch während der Therapie eine Reduktion von infiltrierenden T-Zellen, DZ und inflammatorischen Zytokinen in den betroffenen Hautarealen (41, 42). Hierzu sind jedoch Hautbiopsien notwendig. Daher ist

das Interesse an nicht-invasiven Prädiktoren für das Therapieansprechen groß. Kürzlich konnte eine Studie von Haider *et al.* zeigen, dass Patienten, die keine ausreichende Symptomreduktion durch Alefacept erfuhren, bereits vor Therapiebeginn den T-Zell-Aktivierungsmarker CD69 in peripheren Blutzellen stärker exprimieren, als erfolgreich therapierte Patienten (43).

1.3 Biomarker

Biomarker sind vom Körper produzierte Stoffe, die beispielsweise eng mit der Entwicklung von Krankheiten oder der Wirksamkeit von Medikamenten assoziiert sind. Dazu zählen auch Indikatoren, deren Konzentration im Urin oder Blut vom Normbereich abweicht oder erst dann detektierbar sind, wenn eine bestimmte Krankheit auftritt. So ist zum Beispiel die Glukosekonzentration im Blut bei Diabetes mellitus Patienten stark erhöht und führt dazu, dass Glukose auch über den Urin ausgeschieden wird. Dies ist bei gesunden Menschen nicht der Fall. Zytokine oder Oberflächenmoleküle auf Immunzellen können häufig als Marker für eine gestörte oder unerwünschte Immunreaktion eingesetzt werden. Sie sind, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, essentiell für eine funktionierende Immunabwehr und können auch den vorherrschenden Effektor-T-Zelltyp (Th1, Th2, Th17, Tregs) kennzeichnen. Die Identifikation geeigneter Biomarker, insbesondere für die immunmodulatorische Therapie, ist von besonderem Interesse, weil sie eine individualisierte Therapie ermöglichen könnten. Darüber hinaus unterliegen Medikamente in jedem Patienten einer persönlichen Pharmakokinetik, die eventuell eine individuell angepasste Dosierung erforderlich macht.

1.3.1 TOAG-1

Das Toleranz-assoziierte Gen 1 (TOAG-1) fand erstmals 2007 durch Sawitzki *et al.* Erwähnung in der Literatur (44). Ziel dieser Studie war es, potentielle Marker, die Abstoßungsreaktionen nach allogener Nieren- bzw. Herztransplantation im Ratten- bzw. Maus-Modell frühzeitig anzeigen zu identifizieren. Hierzu wurden sowohl die Transplantat-infiltrierenden Zellen als auch periphere Blut-Leukozyten hinsichtlich ihrer mRNA-Expression von TOAG-1 untersucht. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von TOAG-1 in unbehandelten Tieren, bereits 3 – 5 Tage vor der Abstoßung des Transplantats stark abfiel. Tiere, in denen mit anti-CD4-Antikörpern (Ratte: RIB5/2; Maus: YTS177/DST) Toleranz induziert wurde oder die das Immunsuppressivum Cyclosporin A erhielten, zeigten eine stabil hohe TOAG-1-Expression. Sie korrelierte nach Herztransplantationen im Maus-Modell sogar positiv mit der Funktion des Herzens.

Darüber hinaus analysierten Sawitzki *et al.* die mRNA Transkription von TOAG-1 in verschiedenen Zellpopulationen. So wird TOAG-1 sowohl von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Jedoch zeigten CD11c⁺ und CD11b⁺ Zellen die stärkste TOAG-1-mRNA-Transkription. CD11b/c sind Transmembranproteine, die auch als Integrine bezeichnet werden und eine große Rolle bei der Zelladhäsion und somit auch bei der Zell-Zell-Kommunikation spielen. Dabei wird CD11c auf Dendritischen Zellen und Cd11b meist auf Makrophagen und Monozyten exprimiert.

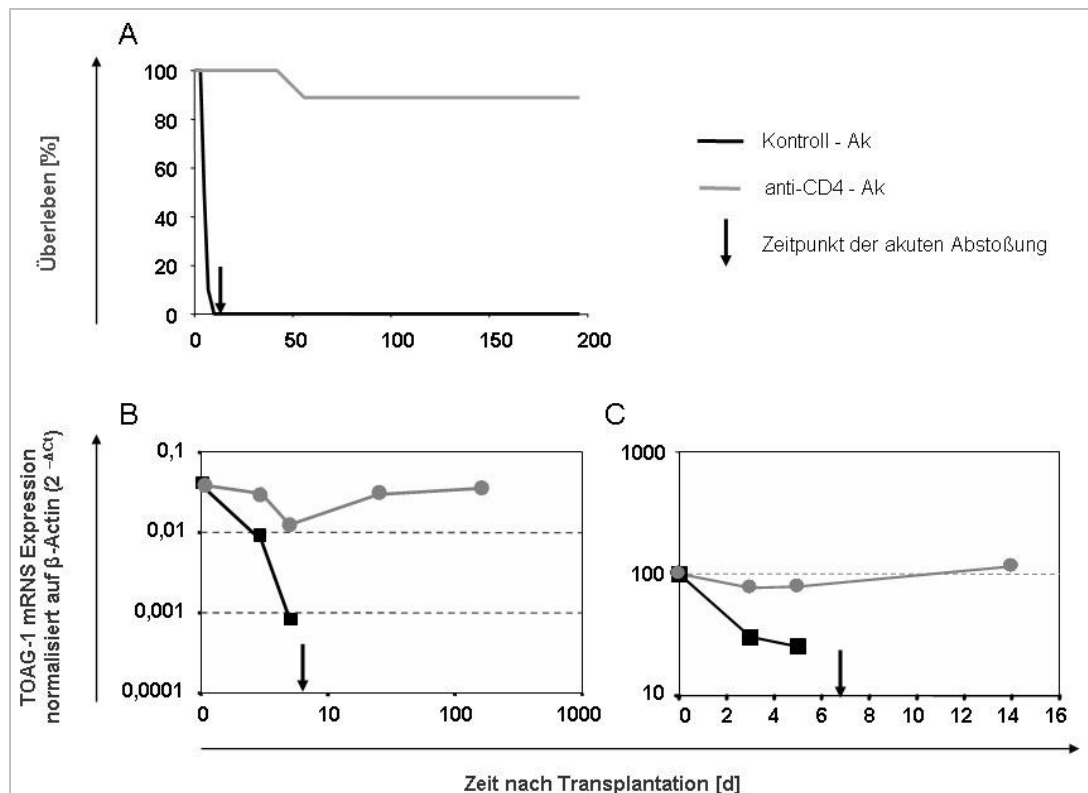


Abbildung 5: Transplantatüberleben und TOAG-1-Transkription nach orthotopischer Nierentransplantation im Ratten-Modell modifiziert nach Sawitzki *et al.* (44):

Dargestellt sind die Ergebnisse von Sawitzki *et al.* (44). **A** zeigt den Anteil überlebender Tiere nach Behandlung mit einem anti-CD4-Antikörper (RIB5/2) in grau bzw. nach Behandlung mit einem wirkungslosen Kontrollantikörper in schwarz. In **B** ist die TOAG-1-mRNA-Expression im Transplantat sowohl nach Behandlung mit anti-CD4-Ak (grau) als auch nach Behandlung mit wirkungslosem Kontrollantikörper dargestellt. **C** zeigt die TOAG-1-mRNA-Expression im Vollblut nach Behandlung mit anti-CD4-Ak (grau) und nach Behandlung mit wirkungslosem Kontrollantikörper

Zusätzlich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass TOAG-1 im Maus-Modell der Colitis, einer Autoimmunerkrankung, ebenfalls herab reguliert war. Dieser starke Abfall der mRNA Transkription von TOAG-1 und die Colitis Symptome konnten jedoch durch Verabreichung von regulatorischen T-Zellen (Treg) verhindert werden. Zusammengefasst legen diese Ergebnisse eine mögliche Beteiligung von TOAG-1 an der negativen Regulation von T-Zellen nahe und zeigen, dass TOAG-1 ein viel versprechender Kandidat auf der Suche nach geeigneten Biomarkern für eine immunmodulatorische Therapie ist.

1.3.2 RHAMM

Als Rezeptor für die Hyaluronan-vermittelte Migration (= receptor for hyaluronan mediated migration), ist RHAMM (= CD168) für die zielgerichtete Bewegung der Zellen erforderlich, die diesen Rezeptor exprimieren (45). Die Interaktion zwischen RHAMM und Hyaluronan spielt eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von Protein-Tyrosinkinasen (PTK), die eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Differenzierung und Wachstum, enzymatisch beeinflussen (46, 47). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von RHAMM durch Makrophagen während der Entzündungsreaktion, nach Bleomycin-induzierter Lungenfibrose im Ratten-Modell, stark erhöht war. Daraufhin wurde ein 5-facher Anstieg der Mobilität von Makrophagen in den Alveolen festgestellt. Die Gabe eines blockierenden anti-RHAMM-Antikörpers (R36) konnte sowohl die Chemotaxis und Anzahl der Makrophagen, als auch das Ausmaß der Lungenschädigung, die durch Bleomycin ausgelöst wurde, drastisch reduzieren (48). Daher ist die Interaktion zwischen RHAMM und Hyaluronan scheinbar von entscheidender Bedeutung bei der Rekrutierung von Immunzellen.

Auch bei Kollagen-induzierter Arthritis im Maus-Modell ist die Interaktion von Hyaluronan mit seinen Rezeptoren, zu denen auch CD44 gehört, für die Ausprägung der Entzündung relevant. Die Bindung von RHAMM an Hyaluronan hatte in Abwesenheit von CD44 in diesem Modell eine verstärkende Wirkung auf die Schwere der induzierten Arthritis. So war auch die Transkription Inflammations-relevanter Gene und die Zellmigration in Abwesenheit von CD44 stark erhöht. Demzufolge kompensiert RHAMM die Abwesenheit anderer Rezeptoren des Hyaluronans, wie CD44, außerdem verstärkt die vermehrte Zugänglichkeit von Hyaluronan zu RHAMM die Entzündung (49).

Darüber hinaus war die transkriptionelle Regulation von RHAMM, ähnlich wie die von TOAG-1, im Nierentransplantations-Modell der Ratte zwischen Toleranz-entwickelnden Tieren und solchen, die ihr Transplantat abstießen, signifikant unterschiedlich [Sawitzki *et al*, noch nicht publiziert]. Diese Beobachtungen sprechen für die eventuelle Eignung von RHAMM als Biomarker während einer Modulation der Immunreaktion beispielsweise durch den Einsatz von Biologika.

1.4 Psoriasis vulgaris

In Deutschland ist die Psoriasis, oder auch Schuppenflechte, die häufigste entzündliche Erkrankung der Haut. Charakteristisch für die Schuppenflechte sind scharf begrenzte, rote, teils juckende, erhabene, mit silberweißen Schuppen bedeckte Läsionen, die typischerweise an den Streckseiten der Arme und Beine, der Kopfhaut aber auch im Genitalbereich lokalisiert sind. Die Nägel können ebenfalls betroffen sein. Die Hautveränderungen werden hauptsächlich durch eine gesteigerte Proliferation bzw. eine gestörte Differenzierung der Keratinozyten hervorgerufen.

Obwohl die Schuppenflechte nicht ansteckend ist, fühlen sich die Betroffenen aufgrund der meist gut sichtbaren Hautveränderungen stigmatisiert und werden häufig ausgegrenzt.

Die Psoriasis wird bereits im Alten Testament erwähnt und ist somit eine seit Langem bekannte Hauterkrankung. Bis vor 20 Jahren wurde als Ursache der Schuppenflechte eine Dysfunktion der Keratinozyten in der Epidermis vermutet, bis die Rolle der T-Zellen bei ihrer Manifestation erkannt wurde. Vor allem die erfolgreiche Therapie der Psoriasis mit Cyclosporin A und weiteren T-Zell-modulierenden Medikamenten untermauerte diese Theorie (50-53). Auch Knochenmarktransplantationen aus anderen medizinischen Gründen konnten die Psoriasis bis auf weiteres heilen (54), aber auch hervorrufen (55). Die Schuppenflechte wird daher heute als chronisch entzündliche, T-Zell vermittelte, Immunerkrankung bezeichnet.

1.4.1 Epidemiologie

Die Psoriasis vulgaris ist weltweit verbreitet und zeigt in den westlichen Industrienationen eine Prävalenz von etwa 2 %. Die Zahl der betroffenen Deutschen liegt bei mehr als 1,6 Millionen Bürgern. Andere ethnische Gruppen wie Schwarzafrikaner und Asiaten erkranken deutlich seltener (56). Jeder fünfte Psoriasis Patient leidet zusätzlich an Psoriasis Arthritis, einer entzündlichen und schmerzhaften Schwellung der Gelenke. Auch Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Adipositas, Diabetes und Bluthochdruck sind häufige Begleiterkrankungen der Schuppenflechte (57). Eine Geschlechter-spezifische Häufung ist nicht festzustellen. Man unterscheidet zwei Subtypen der Psoriasis vulgaris. Etwa 75 % aller Patienten sind von der Psoriasis des Typ 1 betroffen. Dieser manifestiert sich vor dem 40. Lebensjahr und ist durch einen schwereren Krankheitsverlauf und ein schlechteres Ansprechen auf Therapien gekennzeichnet als Psoriasis Typ 2 (> 40. Lebensjahr). Subtyp 1 ist mit einer Häufung bestimmter Humaner Leukozyten Antigenen (HLA) assoziiert. Dabei handelt es sich um HLA-Cw6, HLA-B13, HLA-B17, HLA-Bw57 und HLA DR4 (57, 58). Dies spricht für eine

genetische Prädisposition der Psoriasis. Tatsächlich erkranken Kinder, deren Eltern beide an Psoriasis leiden, mit einer Wahrscheinlichkeit von 75 % ebenfalls daran (59).

1.4.2 Pathogenese der Psoriasis

Die Entstehung der Psoriasis ist noch immer nicht vollkommen aufgeklärt. Die erfolgreiche Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten lenkte die Aufmerksamkeit bezüglich der Pathomechanismen der Psoriasis in Richtung immunologischer Prozesse. Seither wird die Psoriasis als T-Zell-vermittelte Erkrankung betrachtet. Das bisherige Fehlen eines spezifischen „Psoriasis-Antigens“ aber macht die Analyse zugrunde liegender Mechanismen kompliziert. Die Psoriasis könnte durch Superantigene ausgelöst werden (60). Diese mikrobiellen Toxine können T-Zellen antigenunabhängig polyklonal aktivieren. Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass Infektionen mit Streptokokken, deren Toxine als Superantigene wirken können, im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Psoriasis stehen (61, 62). Andere superantigenvermittelte Hautveränderungen sind von der Anwesenheit der Toxin-produzierenden Bakterien abhängig und heilen nach erfolgreicher antibiotischer Medikation schnell ab. Die Psoriasis dagegen entwickelt sich meist erst nach Heilung des Streptokokken-Infektes und die Symptome können zu diesem späten Zeitpunkt nicht durch Antibiotika gelindert werden (63). Darüber hinaus konnten in Psoriasis-Läsionen T-Zellen mit identischen TZR Rearrangements nachgewiesen werden (64). Dies spricht für die Anwesenheit klonal expandierter T-Zellen, die meist antigenabhängig aktiviert wurden. Daher sind die Superantigene der Streptokokken nicht die Antwort auf die Frage nach dem „Psoriasis-Antigen“. Aber sie spielen eine andere Rolle in der Entstehung der Psoriasis. Sie induzieren die Expression von CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen = Lymphozyten assoziierten Antigen der Haut) durch T-Zellen. Dieser Homingrezeptor vermittelt speziell die Auswanderung von T-Zellen in die Epidermis, was zu den frühesten, histologisch nachweisbaren, Veränderungen bei neu entstehenden Psoriasis-Läsionen zählt (65). Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass die Streptokokken-Antigene M auf Aminosäurebasis homologe Strukturen mit dem Keratin aufweisen. Keratin ist im Zytoskelett der Keratinozyten enthalten. Daher kann es zu Kreuzreaktionen (sog. „Molecular Mimicry“) und Expansion von Streptokokken-spezifischen T-Zellen in der Haut kommen (66, 67). Zusätzlich konnte man nachweisen, dass T-Zellen von Psoriasis-Patienten Keratin 17 erkennen und von ihm aktiviert werden können. T-Zellen gesunder Spender dagegen erkannten kein Keratin 17 (68). Daher könnte die Entwicklung Psoriasis-Läsionen durch eine zweite Immunantwort anhand von Gedächtnis T-Zellen, welche die homologen Strukturen von Streptokokken und Keratinen erkennen, ausgelöst werden. Diese Peptide werden ihnen von professionellen Antigen-

präsentierenden Zellen (APZ), wie Monozyten/ Makrophagen und Dendritischen Zellen (DZ), dargeboten. Sabat *et al.* beschrieben 2007 (12) ein Modell der Psoriasis Pathogenese, welches schematisch in Abbildung 6 dargestellt ist. Die genauen Mediatoren, die zur 50-fach erhöhten Proliferation der Keratinozyten führen, sind bisher nicht bekannt. Bei der Entstehung und dem Fortbestehen der Erkrankung spielt die Interaktion zwischen T-Zellen und APZ eine zentrale Rolle. Neben den T-Zellrezeptoren und den MHC-Molekülen ist auch die Ko-Stimulation von entscheidender Bedeutung (z.B. CD2 /LFA-3). Die Blockade der Ko-Stimulation führte zur Reduktion der infiltrierenden T-Zellen, sowie DZ und entzündungs-assoziierten Genen und somit zur Linderung der Psoriasis-symptome (42). Für die Interaktion zwischen T-Zellen und Keratinozyten sind Zytokine essentiell und stehen deshalb auch im Zentrum der pathogenen Mechanismen bei der Psoriasis.

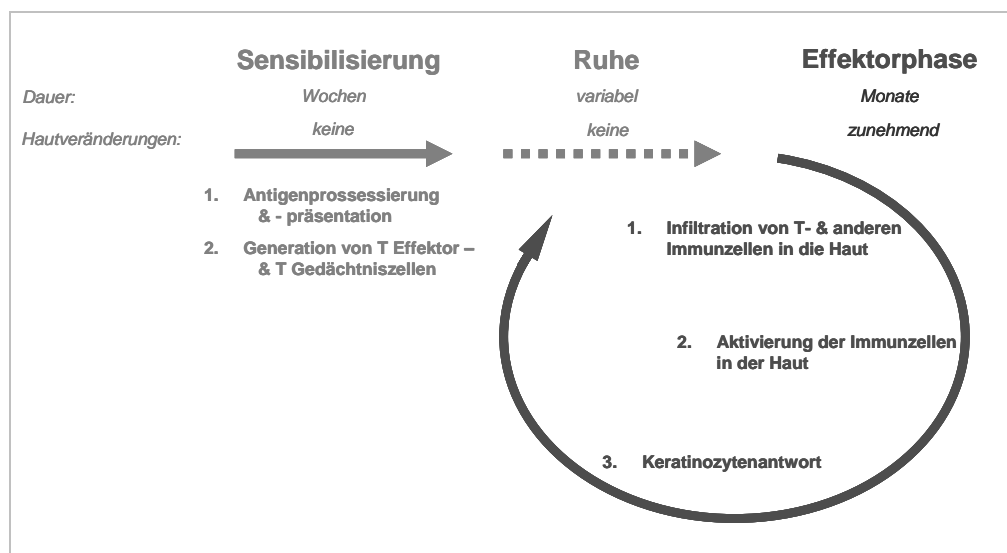


Abbildung 6: Modell der Pathogenese der Psoriasis vulgaris. Modifiziert nach Sabat *et al.* (12)

Die Pathogenese der Psoriasis beginnt mit einer primären Immunantwort z.B. gegen Streptokokken Antigene der Gruppe M und der Bildung von memory T-Zellen in der Sensibilisierungsphase. Daran schließt sich eine Ruhephase mit variabler Dauer an. Es ist bekannt, dass Psoriasis-Läsionen durch Auslöseimpulse, sog. Trigger, hervorgerufen und verstärkt werden. Dazu zählen mechanische Reize (Koebner Reaktion), einige Medikamente und Infektionen (69-71). Diese Trigger bewirken den Übergang in die Effektorphase und somit den Beginn der Läsionenbildung mit Infiltration von T-Zellen, Monozyten /Makrophagen und DZs in die Haut. Dort werden die Immunzellen aktiviert und die Keratinozytenantwort ausgelöst

Die Läsionen zeigen ein besonderes Zytokinmuster aus meist pro-inflammatorische Zytokinen, wie $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-3, IL-6, IL-8 und GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor = Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor). Für IL-6 und IL-8 wurde bereits eine steigernde Wirkung auf die Proliferation der Keratinozyten beschrieben, jedoch nur bei unverhältnismäßig hohen Konzentrationen (72, 73). Sowohl $CD4^+$ T Helfer (Th) Zellen als auch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen tragen zu diesem Zytokinmuster bei. Jedoch scheinen $CD8^+$ T-Zellen stärker $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ zu sezernieren als $CD4^+$ T-Zellen (74). Die Charakteristika der

Psoriasis-typischen T Lymphozyten sind daher dem T Helfer –T-Zelltyp Th1 ähnlich. Indes wird aber auch das, für Th2 charakteristische, IL-5 vermehrt in Psoriasis-Läsionen exprimiert. (74). Th17 Effektor-T-Zellen werden ebenfalls mit der Pathogenese der Psoriasis in Verbindung gebracht, da sie ein hohes Maß an IL-22 sezernieren, welches die Ausschüttung von IL-23 induziert. Für IL-23 wurde nachgewiesen, dass es in engem Zusammenhang mit Entzündungen und Verdickungen der Epidermis und mit der Bildung von Th17 Zellen steht. (75).

1.4.3 Evaluation des Schweregrades

Zur Einschätzung der Ausprägung der Psoriasis und zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs unter einer Therapie, können verschiedene Methoden angewandt werden (76). Durch die Messung des von Hautveränderungen betroffenen Körperoberflächenanteils kann bereits eine Aussage über die Schwere der Erkrankung getroffen werden. Diese Methode wird als BSA (Body surface area = Körperoberfläche) bezeichnet. Sie beurteilt nicht die Ausprägung der Entzündung an den betroffenen Hautarealen. Zur Errechnung der Schwere der Psoriasis nach der BSA-Methode werden bestimmten Körperpartien Anteile an der gesamten Körperoberfläche zugewiesen. So entspricht der Kopf (K) etwa 10 % der Oberfläche eines Menschen. Die oberen Extremitäten (O) gehen mit 20 %, die unteren Extremitäten (U) mit 40 % und der Torso (T) geht mit 30 % in die Berechnung ein. Eine weitere, häufig zur Evaluation der Psoriasis eingesetzte, Methode ist der PASI (Psoriasis area and severity index = Psoriasis Flächen-und Schweregrad-Kennzahl). Seine Berechnung ist in Formel 1 angegeben und enthält zusätzlich zur betroffenen Fläche der Körperpartien (K, O, T, U), auch den Grad der Erytheme (E), der Infiltration (I) und der Schuppung bzw. Desquamation (D) in einem 4-stufigen Punktesystem. Der Wert 0 bezeichnet Symptomfreiheit. Der Wert 1 steht für leichte-, 2 für mittel starke Symptome, 3 für ausgeprägte und 4 für stark ausgeprägte Symptome.

$$\text{PASI} = 0,1 * (E + I + D)_K * A_K + 0,2 * (E + I + D)_O * A_O \\ + 0,3 * (E + I + D)_T * A_T + 0,4 * (E + I + D)_U * A_U$$

Formel 1: Berechnung des PASI.

A: Ausbreitungsfläche, K: Kopf, O: obere Extremitäten, T: Torso; U: untere Extremitäten

Weitere Kennzahlen werden für die Ausbreitungsfläche (A) der Symptome auf der Haut vergeben und lauten wie folgt: 0: 0 %; 1: < 10 %; 2: 10-29 %; 3: 30-49 %; 4: 50- 69 %; 5: 70- 89 % und 6: 90-100 %. Der PASI beinhaltet somit nicht nur die betroffene Körperfläche (A), sondern auch die Ausprägung der Symptome auf dieser Fläche (E, I, D). Eine weitere, sehr ähnliche Methode, ist die Berechnung des PLASI (psoriasis log-based area and severity index = logarithmische Psoriasis Flächen und Schweregrad Kennzahl). Hier wird, als einziger

Unterschied zum PASI, die Zuweisung der prozentualen Ausbreitungsflächen A durch Logarithmieren modifiziert. Darüber hinaus existiert eine Evaluationsmethode, bei welcher der Patient selbst zu einer Einschätzung seiner Symptome befragt wird. Diese Einschätzung nennt sich SAPASI (self-administered PASI = selbst eingeschätzter PASI). Am ehesten hat sich der validierte PASI zur Beurteilung des Therapieverlaufs durchgesetzt. Die Begutachtung sollte über die Therapiedauer nach Möglichkeit immer derselbe Arzt bei einem Patienten vornehmen, um subjektive Schwankungen zu vermeiden. Man spricht von einer erfolgreichen Therapie, wenn der PASI um mindestens 50 % reduziert wurde (77). Eine systemische Therapie oder eine Behandlung mit Biologika ist jedoch nicht bei jedem Patienten gleich wirksam. Zudem wird eine Behandlung mit Biologika erst nach dem Auftreten von Symptomen initiiert. Daher hemmen sie bei Fortbestehen der akuten Symptome die Infiltration und Aktivierung immer neuer Immunzellen in der Haut. Der Kreislauf wird unterbrochen und bereits bestehende Symptome können abheilen. Dies bedeutet, dass die Entwicklung weiterer bzw. die Verschlechterung von bestehenden Läsionen vermieden wird. Daher ist die Wirkung von dieser Immunmodulation meist erst gegen Ende der Therapie am Hautbild ersichtlich.

1.4.4 Konventionelle Therapien der Psoriasis

Ziel der Behandlung der Psoriasis ist es, die Symptome so weit zu reduzieren, dass Betroffene ihr tägliches Leben weitestgehend uneingeschränkt bestreiten können. Je nach Art der Applikation kann die Behandlung der Psoriasis topisch, photochemisch oder systemisch erfolgen. Die topischen Therapien und ihre Kombinationen werden in erster Linie bei milderer Psoriasis angewandt. Dazu zählen vor allem Cremes und Salben, die Steinkohleteer, Dithranol, Vitamin D Analoga oder Glukokortikoide enthalten. Die Wirkung dieser topischen Therapien beruht meist auf der Verminderung der Keratinozytenproliferation und – differenzierung. Wobei Glukokortikoide vor allem entzündungshemmend wirken. Vor einer Anwendung sollten betroffene Hautareale von Schuppen befreit werden. Dazu verwendet man vor allem Salicylsäure in Vaseline als äußerliche Therapie (78). Sind die topischen Therapien nicht (mehr) ausreichend wirksam, so wird zur zweiten Behandlungsphase übergegangen. Dazu zählt vor allem die Phototherapie mit UV-B Strahlen (Breitband UV-B: 290-320 nm oder Schmalband UV-B: 311 nm). Die Phototherapie (UV-A: 320-400 nm) kann auch mit einer Medikation ergänzt werden, die photosensibilisierend wirkt. Diese Kombination wird als PUVA (Psoralene plus UV-A) bezeichnet. Dabei interkalieren Psoralene mit der DNS und steigern die immunsuppressive und Proliferations-hemmende Wirkung der UV-A-Strahlen (78). Wenn die vorangegangenen Behandlungsmöglichkeiten ausgeschöpft sind, greifen Dermatologen zu den

systemischen Therapien (79). Die meisten Patienten, die eine solche Medikation erhalten, sind daher schon sehr Therapie-erfahren. Seit ca. 1960 wird Methotrexat als Medikament gegen Psoriasis-Symptome verabreicht. Es hemmt die Nukleinsäuresynthese und somit die Zellteilung. Es wird ebenfalls bei der Behandlung von Rheuma und Tumoren eingesetzt (80). Methotrexat reduziert die Psoriasis-symptome in ca. 2/3 der Betroffenen um 50 %, ist aber auch mit Nebenwirkungen wie Leberfibrose assoziiert (78). Wie bereits erwähnt, wird auch das immunsuppressiv-wirkende Cyclosporin A als Medikament gegen Psoriasis verschrieben. Es wird auch für die Vermeidung einer Abstoßung nach Organtransplantation eingesetzt aber auch bei anderen Autoimmunerkrankungen. Seine Wirkung beruht auf der Blockierung von Calcineurin, das für die Dephosphorylierung eines Transkriptionsfaktors, NFAT (Nuclear factor of activated T cells), verantwortlich ist. In der Folge kann eine aktivierte T-Zelle eine Reihe von Zytokinen und Oberflächenmoleküle nicht sezernieren bzw. exprimieren. Cyclosporin A gehört zu den wirksamsten systemischen Therapien der Psoriasis, da fast alle Patienten von der Behandlung stark profitieren. Allerdings beschränken Nebenwirkungen wie Bluthochdruck, Nephrotoxizität und eine eventuelle Neigung zu vermehrter Bildung von Hauttumoren die Dauer und die Dosis dieser Therapie. Eine weitere Option der systemischen Therapie ist der Einsatz von Fumarsäure-Ester. Es konnte gezeigt werden, dass sie den PASI Betroffener um etwa 80 % reduzieren (78). Sie führen zu einem Wechsel des Zytokinmusters von Th1 zu Th2, der in der Behandlung der Psoriasis förderlich ist. Auch Fumarsäure-Ester zeigen jedoch unerwünschte Nebenwirkungen. So entwickeln fast 2/3 der Patienten gastrointestinale Probleme und etwa 10 % zeigen einen Verlust von Lymphozyten um mehr als 50 % gegenüber der Anzahl vor Therapiebeginn.

Aus diesem Pool von antipsoriatischen Behandlungsmethoden schöpfen Dermatologen seit geraumer Zeit. Es wird jedoch deutlich, dass alle Medikamente mehr oder weniger stark ausgeprägte Nebenwirkungen aufweisen. Darüber hinaus sind sie bei vielen Patienten aufgrund von Vorerkrankungen der Leber, Nieren oder Verdauungsorgane kontraindiziert. Ein weiterer Nachteil dieser Therapien ist die mangelnde Langzeiterfahrung vor allem bezüglich ihrer Sicherheit, sodass sie nur für eine begrenzte Zeit anwendbar sind und eine Rotationstherapie unumgänglich ist. Ein Bedarf an Nebenwirkungs-armen und innovativen Antipsoriatika ist daher gegeben. Mehrere unter Kapitel 1.2.1 beschriebene Biologika haben das Potential diesen Bedarf zu erfüllen, vor allem da sie nicht nur die Symptome lindern, sondern bereits bei Ihrer Entstehung eingreifen.

2 Zielstellung

Die Identifikation und die genaue Charakterisierung von Markern, die den Erfolg immunmodulatorischer Therapien von Organabstoßungen, Autoimmunerkrankungen oder Tumoren anzeigen, sind von großem wissenschaftlichem und medizinischem Interesse. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Tiere, die ihr Organ abstoßen noch vor den ersten klinischen Anzeichen dafür einen dramatischen Verlust der TOAG-1-mRNS-Expression im Organ und im Blut aufweisen (44). Dieses Gen ist bisher bezüglich Funktion und Lokalisation des Proteins unbekannt. Daraus ergeben sich die drei zentralen Fragestellungen dieser Arbeit:

- *Welche Funktion hat TOAG-1?*

Zur Klärung dieses Aspekts der vorliegenden Arbeit soll zunächst das TOAG-1 Protein durch Transfektion eukaryotischer Zellen mit einem TOAG-1-GFP-Fusionsprotein lokalisiert werden. Die zusätzliche Analyse der TOAG-1-mRNS-Transkription während der T-Zellaktivierung und nach Immunmodulation soll weitere Hinweise auf seine Funktion geben. Darüber hinaus werden funktionelle *in vitro*-Analysen zum mitochondrialen Membranpotential, zur Apoptose und zur Zytokinfreisetzung nach Überexpression von TOAG-1 durch retroviralen Gentransfer in primären murinen T-Zellen angestrebt.

- *Welche Wirkungen hat die Immunmodulation mit dem Biologikum Alefacept *in vitro*?*

Diese Fragestellung soll in gemischten Lymphozytenkulturen (MLC) genauer untersucht werden. Hierzu wird der Einfluss von Alefacept sowohl in peripheren blutmononukleären Zellen (PBMCs), als auch in bestimmten T-Zell-Subtypen untersucht. Es soll der Einfluss von Alefacept auf die Proliferation und die transkriptionelle Regulation, sowie das mitochondriale Membranpotential und die Neigung zur Apoptose analysiert werden. Weiterhin soll eine mögliche Relevanz der negativen Ko-Stimulation (PD-L1) bei der Wirkung von Alefacept aufgeklärt werden.

- *Welche Biomarker (TOAG-1?) eignen sich für das Monitoring von Psoriasis-Patienten unter Alefacept-Therapie?*

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine *in vivo* Studie durchgeführt werden. Hierfür werden 20 Psoriasis-Patienten über einen Zeitraum von 12 Wochen mit dem Biologikum Alefacept behandelt und ihr Krankheitsverlauf beurteilt. Die mRNS-Expression von TOAG-1 und weiteren potentiellen Markergenen wird in wöchentlichen Blutabnahmen und daraus gewonnenen PBMCs analysiert und deren Aussagekraft bezüglich des Therapieansprechens ausgewertet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

³ H-Thymidin	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Agar	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Agarose	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Alefacept	Biogen Idec GmbH, Ismaning
Ampicillin	Merck, Darmstadt
AmpliTaq DNA-Polymerase, Puffer + MgCl ₂	Applied Biosystems, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	Delta Pharma, Pfullingen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Diethyl-Pyrocabonate (DEPC)	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
DMEM-Medium	Life Technologies, Karlsruhe
DNA-marker, 1kb	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
dNTPs	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethydiamin-Tetraessigsäure-Na-Salz (EDTA)	Sigma, Steinheim
Fötale Kälberserum	Seromed, Berlin
Glycerol	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Baker Analysed, Deventer
Kanamycin	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, Steinheim
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lymphozyten Separations Medium	PAA
MMLV-RT	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
MMLV-RT, Puffer-Set	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Natriumazid	Sigma, Steinheim
Natriumpyruvat	Seromed, Berlin
oligo DT	Amersham Pharmacia, Freiburg
Opti-MEM®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, Steinheim
PBS	Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Peressigsäure	Life Technologies, Karlsruhe
Polybren	Sigma, Steinheim
Roti®-Fect	Roth, Karlsruhe
RPMI-Medium	PAA
Trypan Blue	Sigma, Steinheim
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Waldbronn
Bestrahlungsanlage Gamma Cell 40	Atomic Energy, Mississauga, Canada
Beta Counter	PerkinElmer, Wiesbaden
DNS Thermo Cycler (TC1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Durchflußzytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
Einfrierröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Elektrophoresekammer, horizontal & Zubehör	Renner GmbH, Dannstadt

Fluoreszenzmikroskop
 Gel-Imager
 GeneAmp PCR System 9600
 Inkubationsschränke
 Lichtmikroskop
 Neubauer Zählkammer
Real-Time PCR Systeme:
 -ABI PRISM 7700
 -ABI 7500
 Stickstofftanks
 Sterilwerkbänke
 Vivaspin Säulen
 Zellkulturloch Platten
 Zellkulturschalen (6cm, 10cm)
 Zellsiebe, 40 und 100µm Porengröße
 Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)
Zentrifugen:
 -Biofuge Fresco
 -Centrifuge 5402
 -Centrikon T-324
 -Eppendorffzentrifuge 5402

Zeiss, Jena
 Herolab, Wiesloch
 Applied Biosystems, Foster City, U.S.A
 Jouan, Unteraching
 Leica, Braunschweig
 Fein-Optik, Blankenburg
Applied Biosystems, Darmstadt

Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA
 Zapf, Sarstedt
 Satorius, Göttingen
 Falcon, Oxnard, USA
 Falcon, Oxnard, USA
 Falcon, Oxnard, USA
 Falcon, Oxnard, USA

Heraeus, Hanau
 Eppendorf, Hamburg
 Kontron, Neufahrn
 Eppendorf, Hamburg

3.1.3 Versuchssysteme (Kits)

Cytometric Bead Array, TH1/TH2
 First Strand cDNS Synthese Kit
 Gel-Extraktions-Kit
 Magnetische Zellsortierung:
 Human, indirekt, MACS:
 -CD4⁺ T Cell Isolation Kit,
 -CD8⁺ T Cell Isolation Kit
 -Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit,
 -Memory CD4⁺ T Cell Isolation Kit,
 Human, T-Zellen Depletion:
 -RosetteSep® CD3⁺ Depletion
 Murin, indirekte Anreicherung:
 -EasySep® Mouse B Cell Enrichment Kit
 Nukleinsäure Aufreinigung:
 -Absolutely RNA Miniprep Kit
 -QuantiTect Reverse Transcription Kit
 -Qiagen Plasmid Kit Maxi
 -Qiagen Plasmid Kit Mini
 -Qiagen Endofree Maxi Plasmid Kit

Bender MedSystems®, Vienna, Austria
 Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Qiagen, Hilden

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

CellSystems GmbH, St Katharinen

CellSystems GmbH, St Katharinen

Stratagene, La Jolla, CA, USA
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden

3.1.4 Antikörper und Farbstoffe

Durchflusszytometer:
 Anti-human CD19-PE Cy5
 Anti-human CD4-FITC
 Anti-human CD8-PE Cy5
 Anti-human PD-L1-PE
 Anti-murin CD4 mAb-FITC
 Anti-murin CD8 mAb-APC
 Alexa Fluor Maleimide
 Annexin-V-PE
 Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM)

PE Pharmingen, San Diego, CA, USA
 Beckman Coulter, Inc
 Beckman Coulter, Inc
 PE Pharmingen, San Diego, CA, USA
 Pharmingen, San Diego, CA, USA
 PE Pharmingen, San Diego, CA, USA
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 ebioscience, Inc., San Diego, USA
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Zellkultur:

Anti-human CD28 (CD28.2)	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Anti-human CD3 (OKT3)	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Anti-human IgG1 (MH1715)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-murin CD28 mAb (37.51)	PE Biosource, Camarillo, CA, USA
Anti-murin CD3 mAb (145-2C11)	PE Biosource, Camarillo, CA, USA
Anti-murin CD4 mAb (YTS177.9)	Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, UK
LysoTracker Red DND 99	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MitoTracker Red CMXRos	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.1.5 Bakterien und Mausstämme sowie Zelllinien

BALB/c (H2 ^d)	Berliner Institut für Risikobewertung
C57 BL6 (H2 ^b)	Berliner Institut für Risikobewertung
<i>E coli</i> DH5a	
NIH-3T3, Maus-Fibroblasten	DSMZ, Braunschweig
HEK-293, Humane Embryonale Nierenzelllinie	DSMZ, Braunschweig

3.1.6 Puffer und Medien

Tabelle 2: Puffer und Medien

Puffer		Medien	
DEPC-H ₂ O	1 ml Diethyl Pyrocarbonate ad 1000 ml Aqua dest	DMEM	1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 % Fötales Kälberserum*
PBS/BSA	2 % BSA in PBS		
FACS-Puffer	2 % Fötales Kälberserum* 0,1 % NaN ₃ in PBS	LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefeextrakt 10 g/l NaCl
2xHBSP-Puffer	50 mM Hepes 10 mM KCl 12 mM Dextrose (Glucose) 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O pH 7,05	RPMI	4 mM L-Glutamin 100 µ/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 10 % Fötales Kälberserum* +/- 5 mM β-ME

* = hitzeinaktiviert bei 56°C

3.1.7 Primer und Sonden für quantitative real time PCR

Tabelle 3: Primer und Sonden für TaqMan PCR

Alle Primer außer CD69 wurden von Metabion und alle Sonden von Eurogentech bezogen

Gen	human (5'-3')	murin (5'-3')
HPRT	vw: agtctggcttatatccaacacttcg rw: gactttgctttccttggtcagg Sonde: ttcaccagcaagcttgcgaccttga	vw: atcattatgccgaggatttgaa rw: ttgacacacagaggcca Sonde: tggacaggactgaagacttgctcgagatg
CD3	vw: aggacaaagaatctaccgtgcaag rw: tgacatcagtgacaatgatgcca Sonde: tcattatcgaatggccagagctgtgtgg	vw: attgcgggacaggatggag rw: cttggagatggctgtactgtgca Sonde: tcgccagtcaagagcttcagacaagca
TOAG-1	vw: tggtttacaatgatccttaacagtgac rw: tctctcttgctgctgagcttt Sonde: ccaacactctgtgatccagcaaatctccag	vw: ccttctacaaccagctgctgaga rw: aatgcccagttcatgcaag Sonde: tgatccttagcagtgacaggtatgcgcc
RHAMM	vw: aaaggctggtcaagcaattgg rw: gcctgggtatgagcagcactac Sonde: agctgaaaggaaggaggctgaactggag	
Foxp3	vw: aagtggcccggatgtgaga rw: cattgtgccctgcccttct Sonde: acttctcaagcactgccagggcg	
CD69	Applied Biosystems, Darmstadt	

3.2 Methoden

3.2.1 Klonierung der kodierenden Sequenz des murinen TOAG-1

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung diente der pCMV-Sport6 Klon mit dem murinen TOAG-1 (IRAKp961K07177) von RZPD. Alle Standardmethoden, wie Plasmidpräparationen, Restriktionsspaltungen, gelelektrophoretische Trennungen, usw. wurden nach Maniatis (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989) bzw. dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle für diese Arbeit relevanten, modifizierten Methoden werden hier aufgeführt.

3.2.1.1 Flankierung und Vervielfältigen des kodierenden Bereichs von TOAG-1

Der kodierende Bereich des murinen TOAG-1 Gens wurde in dieser Arbeit in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Für die Erstellung eines Fusionsproteins wurde TOAG-1 in den EGFP-N1 Vektor kloniert. Er enthält die Sequenz des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP). Für ein funktionales Fusionsprotein musste das Stopcodon von TOAG-1 vor der Ligation in den EGFP-N1 entfernt werden. Daher wurden während der PCR zur Vervielfältigung von TOAG-1 die rückwärtigen Primer so gewählt, dass sein Stopcodon nicht auf den Tochterstrang übertragen wurde. Die vorwärts und rückwärts-Primer enthielten zusätzlich Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, welche die Umklonierung in andere Vektoren ermöglichten.

Weiterhin wurde TOAG-1 zur Herstellung von Retroviren in einen retroviralen Expressionsvektor, dem pLXSN-IRES-GFP, kloniert. Zu diesem Zweck war das Stopcodon von TOAG-1 erforderlich und die Primer wurden deshalb so modifiziert, dass es erhalten blieb. In Tabelle 4 sind alle verwendeten Primersequenzen mit Restriktionsschnittstellen aufgeführt.

Tabelle 4: Klonierungsprimer von Metabion

	Primer 5'-3'	RE-Schnittstelle
vorwärts:	gcg ccc aga tct atg ttt tgc cac ttg	Bgl II
rückwärts: mit Stop	cgc cgg gtc gac tta ctt cat ggc ttc	Sal I
	cgc cgg gga tcc tta ctt cat ggc ttc	Bam HI
ohne Stop	cgc cgg gga tcc ggg tta ctt cat ggc ttc	Bam HI

Die verwendete Polymerase (Polymerase Easy A) erstellt während einer PCR einen Poly A-Überhang am 3'-Ende, der zur späteren Ligation in den Klonierungsvektor pDrive mit Poly U-Überhängen unerlässlich ist. Das Thermal-Programm und die verwendeten Chemikalien für die PCR sind in Tabelle 5 dargestellt, wobei die Annealingtemperaturen dem Schmelzpunkt des jeweiligen Primerpaares angepasst wurden.

Tabelle 5: PCR-Ansatz und Thermal-Programm

PCR-Ansatz		Zykler-Programm		
Easy A Puffer:	2,5 µl	95 °C	2 min	5 Zyklen
dNTP's (2,5 mM):	0,2 µl	95 °C	40 s	
vorwärts Primer (10 ng/µl)	0,5 µl	59 °C	30 s	
rückwärts Primer (10 ng/µl)	0,5 µl	72 °C	2 min	
Template: [5 ng/µl]	1 µl	95 °C	40 s	25 Zyklen
Polymerase Easy (5 U/µl):	0,25 µl	64 °C	30 s	
dH ₂ O:	ad 25 µl	72 °C	2 min	
		72 °C	7 min	
		4 °C	∞	

3.2.1.2 Aufreinigung des PCR Produktes mittels Gelextraktion

Das PCR Produkt wurde anschließend auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Herstellung des Agarosegels erfolgte in 1xTAE Puffer. Die Agarose wurde durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (ca. 20 µg EB/100 ml) versetzt. Zur Feststellung der Fragmentgröße des PCR Produktes wurde zusätzlich ein 1 kb Marker auf das Agarosegel aufgetragen und eine Spannung von etwa 100 mV angelegt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung nach der Größe wurde das DNS-Fragment mit UV-Licht anhand des fluoreszierenden, interkalierenden Ethidiumbromids detektiert. Die digitale Auswertung erfolgte mit Hilfe des Gel Imager Systems.

Die TOAG-1 DNS Bande war bei 1400 bp sichtbar und wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des Qiaex II Gelextraktionskits nach den Angaben der Firma Qiagen aufgereinigt. Die Konzentration der DNS wurde photometrisch oder durch Quantifizierung mit dem Gel Imager bestimmt.

3.2.1.3 Ligation von TOAG-1 in den pDrive Klonierungsvektor

Der pDrive Klonierungsvektor wird linearisiert zur Verfügung gestellt. Er trägt zwei Antibiotikaresistenzen (Kanamycin und Ampicillin) und das *Lac Z* Gen, welches die Blau-Weiß Selektion über den Nährstoff X-Gal erlaubt. Die Ligation von TOAG-1 in den pDrive erfolgte nach Herstellerangaben mit 50 ng pDrive Plasmid-DNS und äquivalenter molarer Masse des Inserts (TOAG-1) bzw. in drei bis fünffachem Überschuss. Die hierfür zugrunde gelegte Berechnung ist in Formel 2 dargestellt.

$$\text{ng}_{\text{[PCR Produkt]}} = \frac{\text{ng}_{\text{[Zielvektor]}} \times \text{bp}_{\text{[PCR Produkt]}}}{\text{bp}_{\text{[Zielvektor]}}} \times (\text{X-facher Überschuss})$$

Formel 2: Berechnung molarer Massenäquivalente für die Klonierung

In einem 10 µl Ansatz wurden zu 1 µl (=50 ng) Vektor, 5 µl des zweifach konzentrierten Ligationsmastermixes und 1-4 µl des PCR Produkts (Insert) pipettiert. Anschließend wurde mit destilliertem, im Kit enthaltenen, Wasser ad 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert und anschließend zur Transformation eingesetzt.

3.2.1.4 Transformation von *E. coli*

Die Herstellung und Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte mit der Kalzium-Chlorid Methode nach Maniatis. Für antibiotikahaltige Platten wurde während des Abkühlens 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin beigemischt.

Anschließend wurden 150 µl kompetente *E. coli* DH5α Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 30 min im Eisbad belassen. Der Ansatz wurde für exakt 45 Sekunden auf 42 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 750 µl LB-Medium wurden die Zellen 45 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Mengen des Transformationsansatzes auf antibiotikahaltige Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Mittels Blau-Weiß Selektion konnten nun weiße, erfolgreich ligierte Kolonien von blauen Kolonien ohne Insert unterschieden werden. Weiße Kolonien wurden zur weiteren Charakterisierung durch „Mini“-Plasmidpräparation (3.2.1.5) und

anschließender Restriktion in 3 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum angezüchtet. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttler bei 220 rpm inkubiert.

Zur Langzeitlagerung wurde 1 ml dieser Über-Nacht-Kultur mit Glycerol im Verhältnis 4:1 vermischt und bei -70 °C gelagert. Zur kurzfristigen Lagerung wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, bei 37 °C über Nacht inkubiert und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.1.5 DNS-Präparation und Kontrolle des Inserts

Die Isolierung der Plasmid-DNS erfolgte aus einer 3 ml Über-Nacht-Kultur der jeweiligen Kolonie mittels Qiagen Plasmid Mini Kit nach den Angaben des Herstellers.

Zur Kontrolle, ob ein Klon das TOAG-1 Insert in der richtigen Orientierung enthält, wurde die Plasmid-DNS mit Restriktionsenzymen nach Angaben des Herstellers für 1 h bei 37 °C geschnitten und anschließend elektrophoretisch nach Größe in einem 1,5 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die Restriktionsenzyme wurden hierbei so gewählt, dass unterschiedliche Fragmentgrößen entstehen wenn das Insert in richtiger oder falscher Orientierung enthalten ist. Dies konnte mit Hilfe der Vektorkarte des pDrive Klonierungsvektors und der Sequenz des TOAG-1 Inserts antizipiert werden. Für Klone, deren Insert in der richtigen Orientierung vorlag, wurde die Sequenzierung des Inserts durch die Firma MWG veranlasst und anschließend mit der TOAG-1 Sequenz verglichen. Lagen keine Mutationen vor, so konnte der Klon weiter verwendet werden.

3.2.1.6 Konstruktion eines Fusionsproteins aus TOAG-1 und EGFP

Für die Konstruktion eines Fusionsproteins aus TOAG-1 und EGFP wurden sowohl der Zielvektor pEGFP-N1 als auch der pDrive, der das TOAG-1 Insert enthält, in zwei separaten Restriktionsansätzen mit den Restriktionsenzymen *Bgl II* und *Bam HI* 5 h bei 37 °C geschnitten. Anschließend wurden beide Ansätze auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Ein 1 kb Marker wurde als Größenorientierung mitgeführt. Sowohl die Bande des linearisierten Zielvektors pEGFP-N1 als auch die Insert-Bande von TOAG-1 wurden aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mittels Qiaex II Gelextraktionskit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Der DNS Gehalt wurde photometrisch bestimmt. Die Ligation erfolgte mit der T4 Ligase nach Herstellerangaben, wobei die DNS Mengenverhältnisse von Insert und Zielvektor über die in Formel 2 dargestellte Vorschrift berechnet wurden. Auch hier wurde die DNS des Inserts und des Zielvektors mit äquivalenten molaren Massen oder mit drei bis fünffachem Überschuss des Inserts eingesetzt. Das weitere

Vorgehen erfolgte analog zur Transformation und Kontrolle der pDrive Klone, wie bereits beschrieben (3.2.1.4 und 3.2.1.5).

Zur Vermehrung eines TOAG-1-EGFP-Klons mit der richtigen Sequenz, wurde sein Glycerolstock verwendet, um eine Vorkultur von 3 ml anzupflegen. Nach 5 h im 37 °C Schüttelinkubator wurde damit eine Übernachtskultur von 300 ml LB Medium überimpft und am nächsten Morgen die Plasmid-DNS mit dem Qiagen Endofree Maxi Plasmid Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die DNS Menge wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.1.7 Klonierung von TOAG-1 in einen retroviralen Vektor

Für die Klonierung von TOAG-1 in einen retroviralen Vektor wurde der pLXSN-IRES-GFP verwendet. Dieser Vektor beinhaltet die Sequenz des bereits erwähnten Reportergens GFP hinter einer internen Ribosomenstartstelle („internal ribosomal entry site“, IRES). Die Ligation des codierenden Bereichs von TOAG-1 mit intaktem Stopcodon erfolgte vor der IRES über die Restriktionsschnittstellen für *Sal I*. Die Sequenz von TOAG-1 wurde zu diesem Zweck mit dem Restriktionsenzym *Sal I* aus dem Klonierungsvektor pDrive ausgeschnitten. Der Zielvektor pLXSN-IRES-GFP wurde zugleich mit *Sal I* linearisiert und anschließend mit CIP nach Herstellerangaben dephosphoryliert, um einer Religation des Vektors ohne Insert entgegenzuwirken. Alle weiteren Schritte wie Auftrennung durch Gelelektrophorese, Aufreinigung durch Qiaex II Gelextraktionskit und Ligation mit der T4 Ligase wurden bereits in früheren Kapiteln beschrieben. Ob das jeweilige Insert enthalten war und in der richtigen Orientierung vorlag, wurde erneut durch Restriktion mit verschiedenen Restriktionsenzymen ermittelt.

3.2.2 Lokalisation von TOAG-1 durch Transfektion von NIH-3T3-Zellen

3.2.2.1 Transiente Transfektion mit Roti-fect

Plasmid-DNS bildet mit kationischen Lipiden einen Komplex, der in die Zellen aufgenommen wird. Roti-fect ist eine solche Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids und wurde zur Transfektion von NIH-3T3-Zellen verwendet.

Zur besseren Handhabung der Zellen während der anschließenden Färbungen wurden in jede Vertiefung einer 24 Loch Zellkulturplatte ein Deckgläschen mit 10 mm Durchmesser gelegt. Um den Zellen einen idealen Untergrund für die Adhäsion zu bieten, wurden diese Deckgläschen zusätzlich mit 0,2 % Gelatine für 1 h bei 37 °C beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) und anschließendem Trocknen, wurden dann, einen Tag vor

der Transfektion, 5×10^4 NIH-3T3-Zellen in DMEM Medium ohne Antibiotika in jede Vertiefung pipettiert. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren sie zu 60 % konfluent gewachsen. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium jeder Vertiefung mit Vollmedium (DMEM + 10 % FKS) auf 1 ml aufgefüllt. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bezüglich Ihrer GFP-Expression und somit der Transfektionseffizienz begutachtet und anschließend organellspezifisch gefärbt.

3.2.2.2 Färbung der Mitochondrien

Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und mit neuem DMEM versetzt, welches 10 % FCS und 75 nM MitoTracker® Red CMXRos enthielt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Färbelösung abgenommen und jedes Deckgläschen in seiner Vertiefung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für weitere 15 min überschichtet und somit fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS einmal gewaschen, jedes Deckgläschen aus der Vertiefung entnommen und mit der Zellschicht nach unten auf einen Objektträger gelegt, der zuvor mit einem Tropfen Vectorschield Mounting Medium versehen wurde. Dieses Eindeckmedium ist für Fluoreszenzmikroskopie geeignet und enthält bereits den Farbstoff DAPI. Die Bilder jeder einzelnen Fluoreszenz wurden innerhalb von wenigen Stunden mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

3.2.2.3 Färbung der Lysosomen

Die Färbung der Lysosomen erfolgte, analog zur MitoTracker® Red CMXRos Färbung, mit 75 nM LysoTracker® Red für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.2.3 Retroviraler Gentransfer von TOAG-1 in primäre, murine CD4⁺ T-Zellen

3.2.3.1 Produktion eines TOAG-1 Retrovirus

Für die Produktion eines Retrovirus sind drei Gen-Bereiche notwendig. Ein Bereich codiert die so genannten „gruppenspezifischen Antigene“ (*gag*). Dabei handelt es sich um Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine. Ein weiterer Bereich ist für die Produktion der viralen Enzyme, wie der Intergrase, der Protease und der Reversen Transkriptase zuständig, und wird als *pol* bezeichnet. Die Gen-Sequenz, die Informationen für die Bestandteile der Virushülle enthält wird *env* genannt. Die beiden Gen-Bereiche *gag* und *pol* lagen zusammen in einem Plasmid (CMV-*gag-pol*) vor, *env* wurde von einem separaten Plasmid kodiert (CMV-*env*). Beide Vektoren enthalten einen CMV-Promotor. Für die Gewinnung eines TOAG-1-Retrovirus wurde das

konstruierte TOAG-1-pLXSN-IRES-GFP Plasmid und für die Produktion eines geeigneten Kontrollvirus, die Plasmid-DNS des leeren pLXSN-IRES-GFP Vektors verwendet. Die Isolation der Plasmid-DNS erfolgte mit Hilfe des Endofree Plasmid Maxi Kits von Qiagen. Die Verpackung des Virus wurde in HEK-293-Zellen durchgeführt. Dazu wurden HEK-293-Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und kultiviert. Die Transfektion der Zellen erfolgte bei 60- bis 80 %iger Konfluenz. Zwei Stunden bevor der Transfektionsansatz auf die Zellen gebracht wurde, erfolgte ein Mediumwechsel. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 6: Transfektionsansatz für Virusproduktion

(TOAG-1)-pLXSN-IRES-GFP	10 µg
CMV-gag-pol	5 µg
CMV-env	2,5 µg
Kalziumchlorid (2 M)	31 µl
dH ₂ O	ad 250 µl

Die Plasmid-CaCl₂-Mischung wurde mit 250 µl 2 x HBS-Puffer vorsichtig vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der gesamte Ansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte zunächst für 14 h bei 37 °C mit anschließendem Mediumwechsel mit 3 ml DMEM. Die Virusproduktion erfolgte bei 32 °C für weitere zwei Tage. Viruspartikel im Überstand wurden dann mit Hilfe von Zentrifugation bei 3000 g für 40 min bei 4 °C in Vivaspın-20-Filtersäulen konzentriert, aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.3.2 Bestimmung der GFP Transduktionseffizienz eines Virusstocks

Zur Bestimmung der GFP Transduktionseffizienz wurden NIH-3T3-Zellen mit den gewonnenen Überständen (TOAG-1-GFP bzw. Kontroll-GFP-Virus) aus der Virusproduktion infiziert. Hierfür wurden am Tag vor der Infektion 4×10^4 Zellen/ml in eine 96-Lochplatte ausgesät.

Am nächsten Tag wurden die aufkonzentrierten Überstände der Virusproduktion aufgetaut und 1:2 in DMEM Vollmedium (10 % FKS, 4 mM L-Glutamin und 100 µg/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin) verdünnt und mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml Polybren versetzt. Der Kulturüberstand der NIH-3T3-Zellen wurde am Tag 1 abgenommen und bei 37 °C asserviert. Anschließend wurden je zwei Vertiefungen mit 100 µl des jeweiligen, verdünnten Virusüberstands (TOAG-1 bzw. Kontrollvirus) überschichtet, für 90 min bei 32 °C und 1800 rpm zentrifugiert und 5 h bei 32 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurde der Virusüberstand mit dem Kulturüberstand von Tag 1 ersetzt. Nach weiteren 3 Tagen Inkubation bei 32 °C und 5 % CO₂, erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der GFP-Expression, die Aufschluss über den Anteil erfolgreich GFP transduzierter NIH-3T3-Zellen gibt.

3.2.3.3 Gewinnung der Zellpopulationen

Für die Gewinnung von primären, murinen Zellen wurden die Milzen und Lymphknoten von C57/BL6 Mäusen entnommen und durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt. Die gewonnenen Einzelzellsuspensionen wurden mit PBS gewaschen. Milzeinzelzellsuspensionen wurden zusätzlich einer Erythrozytenlyse unterzogen. Dazu wurde das Zellpellet mit 1 ml H₂O kurzzeitig vermischt, wodurch die Erythrozyten aufgrund ihrer geringeren osmotischen Resistenz, verglichen mit PBMCs, platzen. Die anschließende Zugabe von 5 ml PBS/BSA stoppt die Reaktion bevor auch die PBMCs dem osmotischen Druck nachgeben. Mit Hilfe eines 40 µm Zellsiebes, wurden die Zellen anschließend vereinzelt, in PBS aufgenommen und gezählt. Die aus Lymphknoten gewonnene Einzelzellsuspension wurde keiner Erythrozytenlyse unterzogen aber ebenfalls über ein 40 µm Zellsieb gegeben und gezählt. Aus den so gewonnenen Zellen wurden verschiedene T-Zellsubpopulationen isoliert. Die Anreicherung von CD4⁺ Zellen erfolgte mit dem CD4⁺ T Cell Isolation Kit von Miltenyi Biotec. Die Isolation von B-Zellen erfolgte ausschließlich aus der Splenozytensuspension mittels Mouse B Cell Enrichment Kit der Firma StemCell. Beide Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch nach einer Färbung mit anti-CD4 FITC-Antikörper für CD4⁺ T-Zellen oder anti-CD19 PE-Antikörper für die B-Zellen bestimmt und erreichte über 95 %.

3.2.3.4 Stimulation der murinen T-Zellen

Zum Zwecke der Überexpression von TOAG-1 wurden die gewonnenen primären CD4⁺ T-Zellen von C57/BL6 Mäusen vorstimuliert. Hierzu wurden anti-Maus-CD3 und CD28-Antikörper an die Oberfläche der Vertiefungen einer 96-Loch-Flachbodenplatte gebunden. Diese wurden mit jeweils 100 µl der Antikörperlösung (6 µg/ml anti-Maus CD3 and 4 µg/ml anti-Maus CD28 in PBS) für 1 h inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit kaltem PBS entfernt. Anschließend wurden gleiche Mengen an CD4⁺ T-Zellen und syngener B-Zellen (je 3x10⁶ Zellen/ml) in einem Gesamtmediumvolumen von 200 µl pro Vertiefung ausgesät und für 18 h inkubiert.

Für Genexpressionsanalysen von TOAG-1 wurden primäre T-Zellen aus C57/BL6 Mäusen auch mit allogenen B-Zellen aus Balb/c Mäusen in einer gemischten Lymphozyten-Kultur (MLC, mixed lymphocyte culture) stimuliert. Hierzu wurden gleiche Mengen an CD4⁺ T-Zellen aus C57/BL6 und allogene B-Zellen (je 3x10⁶ Zellen/ml) aus BALB/c Mäusen in einem Gesamtmediumvolumen von 200 µl pro Vertiefung ausgesät und inkubiert.

3.2.3.5 Retrovirale Transduktion

Es wurden ausreichend Aliquots des aufkonzentrierten Überstands der Virusproduktion (3.2.3.1) aufgetaut und 1:2 in RPMI Vollmedium (10 % FKS, 4 mM L-Glutamin und 100 µg/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 5 mM β-ME) verdünnt und mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml Polybren versetzt. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zu Kapitel 3.2.3.1. Die primären Zellen wurden jedoch 5 Tage lang inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch bezüglich ihrer Zytokinproduktion (3.2.8.3) und Apoptoseneigung sowie ihres mitochondrialen Membranpotentials (3.2.8.2) charakterisiert. Weiterhin wurden die Zellen für die Analyse von mRNS-Expressionsniveaus mittels qRT-PCR(3.2.6) geerntet.

3.2.4 Immunomodulation mit Alefacept *in vitro*

3.2.4.1 Stimulation von humanen T-Zellen

Für die Anreicherung von humanen T-Zellen wurde Blut von gesunden Spendern verwendet, welches 1:2 mit PBS verdünnt und anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation in Erythrozyten, periphere blutmononukleäre Zellen (PBMCs) und Plasma aufgetrennt wurde. Hierzu wurden 3 ml des Lymphozytenseparationsmediums LSM 1077 mit 8 ml verdünntem Blut überschichtet und für 45 min bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die entstandene Zellschicht (= PBMCs) über dem LSM 1077 Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Für die Isolierung bestimmter T-Zell Subpopulationen wurden folgende Kits der Firma Miltenyi Biotech verwendet: CD4⁺ T Cell Isolation Kit, Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit, Memory CD4⁺ T Cell Isolation Kit und CD8⁺ T Cell Isolation Kit. Die Isolation erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Für die Aktivierung der humanen T-Zellen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Strategien angewandt: a) Stimulation durch allogene Antigen-präsentierende Zellen (APZ) eines zweiten gesunden Spenders oder durch b) an die feste Phase gebundenen anti-human CD3 und -CD28-Antikörper. Für die allogene T-Zellaktivierung mit APZ wurden PBMCs eines zweiten gesunden Spenders isoliert und anschließend mit dem „Human CD3 Depletion Cocktail“ der Firma StemCell behandelt, sodass die gewonnene Zellpopulation keine T-Zellen mehr enthielt. Anschließend wurden gleiche Mengen an zuvor isolierten T-Zellen (bzw. Subpopulationen) und APZ (je 3x10⁶ Zellen/ml) in einem Gesamtmediumvolumen von 200 µl pro Vertiefung, ausgesät und als gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC, mixed lymphocyte culture) weiter inkubiert.

Die Aktivierung humaner T-Zellen, in Abwesenheit von APZ, allein mit Festphasen-gebundenen anti-human CD3 und anti-human CD28-Antikörpern erfolgte analog zur Stimulation muriner T-

Zellen (3.2.3.4) unter Austestung verschiedener Antikörperkonzentrationen und ohne syngene B-Zellen.

3.2.5 Alefacept Studie an Psoriasis Patienten

3.2.5.1 Studienkonzept

In die Studie wurden 20 statistisch ausgeglichene Patienten (17 Männer, 3 Frauen, zwischen 28 und 70 Jahren) mit mittlerer bis schwerer Psoriasis (PASI: 7-36) eingeschlossen. Ihnen wurde über einen Zeitraum von 12 Wochen einmal wöchentlich 15 mg Alefacept intramuskulär verabreicht. Vor Therapiebeginn und zum Zeitpunkt jeder Medikamentengabe wurden die Patienten durch einen Dermatologen der Charité durch Ermittlung des PASI bezüglich des Schweregrads der Psoriasis beurteilt und ihnen wurde Blut abgenommen. Die Therapie wurde als erfolgreich angesehen, wenn der PASI bis Ende der Therapie um mindestens 50 % reduziert war. Diese Definition zeigte sich bereits in anderen Studien als klinisch relevant (77).

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité Berlin bewilligt. Die Prozessnummer lautet: 1862/Si. 262 EK-Vorg.:1310/2000.

3.2.5.2 Probenaufbereitung

Aus dem Patientenblut wurden am Tag der Abnahme PBMCs isoliert wie unter Punkt 3.2.4.1 beschrieben. Diese wurden als Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die weitere Analyse wurde die RNS mittels „Absolutely RNA Miniprep Kit“ von Stratagene nach Herstellerangaben extrahiert und in 2 Schritten mit je 22 µl Elutionspuffer eluiert. Die Synthese der cDNS erfolgte anschließend mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen.

3.2.6 Genexpressionsanalyse mit qRT-PCR (TaqMan®-Technologie)

Die Real Time Polymerase Kettenreaktion wurde im 7500 Sequence Detection System durchgeführt. Zur Normalisierung der Zielgenexpression wurde das konstitutiv exprimierte Gen HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) verwendet. Alle Ansätze wurden in 96-Lochplatten als Doppelbestimmungen vorbereitet. In jedes Reaktionsgefäß wurde je 1 µl cDNS vorgelegt und anschließend mit 12 µl des jeweiligen Mastermixes (Zusammensetzung siehe Tabelle 7) vermischt. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und die 40 Zyklen umfassende Messung (genaues Programm siehe Tabelle 8) gestartet. Alle verwendeten Primer und SONDENSEQUENZEN sind unter Punkt 3.1.7 in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermix für die qRT-PCR

Volumen[μ l]	Mixbestandteil
6,25	Mastermix
2,25	Aqua ad injectabilia
3	Primermix (forward + reverse)
0,5	Sonde

Tabelle 8: Programm der qRT-PCR

Dauer	Temperatur	Beschreibung
2 min	50 °C	Uracil-DNS-Glykosylase (Ung) Verdau
10 min	95 °C	Inaktivierung der Ung & Aktivierung der Ampli TaqGold
15 s	95 °C	Denaturierung
60 s	60 °C	kombinierter Annealing und Extensionsschritt
	4 °C	Kühlen der PCR Produkte

3.2.7 Proliferationsassay

Die Proliferation der aktivierten T-Zellen wurde mittels ^3H -Thymidin Inkorporation gemessen. Hierzu wurden die Zellen für einen Zeitraum von 18 h mit 0,028 MBq ^3H -Thymidin versetzt und anschließend bis zur Messung im Beta Counter bei -80 °C gelagert.

3.2.8 Durchflusszytometrie

Die Datenaquise erfolgte mit dem FacsCalibur der Firma BD und dem Programm Cellquest. Die Daten wurden mit der Cytomation Summit Software ausgewertet.

3.2.8.1 Detektion von Zelloberflächenmolekülen

Für die durchflußzytometrische Analyse wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Standardmäßig wurden die Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, wenn vom Hersteller kein anderes Gebrauchsvolumen angegeben wurde. Die Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte bei 4 °C für 15 min. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 1 ml Facs-Puffer entfernt.

3.2.8.2 Detektion des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und des Anteils apoptotischer Zellen

Zur Detektion des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) wurden je $1 \cdot 10^6$ Zellen mit 37 °C warmen PBS/ BSA geerntet und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μ l warmen PBS/ BSA, welches 150 nM Tetramethylrodamin Methylester (TMRM) enthielt, aufgenommen und für 15 min bei 37 °C gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit warmen PBS/ BSA wurden die Zellen in PBS/ BSA mit 15 nM TMRM (= Erhaltungsdosis) aufgenommen und schnellstmöglich gemessen. Wurden die Zellen zusätzlich mit einem Zelloberflächenantikörper gefärbt, so geschah das zeitgleich mit der TMRM-Färbung bei 37 °C.

Für die Analyse der Apoptoseneigung der Zellen wurden sie mit Annexin-V-PE gefärbt. Dies erfolgte laut Herstellerangaben für 15 min bei 4 °C.

3.2.8.3 Zytokinproduktion in Zellkulturüberständen

Für die Untersuchung der Zytokinproduktion von TOAG-1 überexprimierenden murinen T-Zellen wurde der TH1/TH2 Cytometric Bead Array (CBA) von Bender MedSystems® verwendet.

Hierzu sind Zellkulturüberstände der Stimulationen zu den angegebenen Zeitpunkten abgenommen und bis zur Färbung nach Herstellerangaben bei -80 °C gelagert worden.

3.2.9 Statistik

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit SPSS 12.0. Die Fragestellung in dieser Arbeit lautete sowohl in den *in vitro* Analysen von Alefacept als auch in der Studie mit Psoriasis-Patienten, ob sich zwei Populationen hinsichtlich ihrer Lage unterscheiden. Dies kann einerseits die mRNA-Expression oder die Anzahl von T-Zellsubtypen behandelter und unbehandelter Gruppen bzw. Proben betreffen oder auch Patienten, die auf eine Therapie ansprechen oder nicht. Deshalb wurde für diese Statistik der Mann Withney U Test verwendet. Dabei handelt es sich um einen verteilungsfreien bzw. nichtparametrischen Test, der allen erhobenen Daten Ränge zuweist, die anschließend stichprobenartig zwischen den Gruppen verglichen werden. Unterscheiden sich beide Gruppen nicht voneinander, so sind die Ränge einer Gruppe rein zufällig unter allen Rängen verteilt. Die Teststatistik U zählt, wie oft Werte der einen Gruppe größer sind als die der anderen.

Zur Ermittlung eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen verbundenen Stichproben wurde der Wilcoxon Test verwendet. Er basiert, wie der Mann Withney U Test, auf der Ranglogik und vergleicht zwei Proben der gleichen Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Signifikanz wird als p-Wert angegeben und beschreibt die Zufalls-Wahrscheinlichkeit eines Unterschieds. Je geringer dieser p-Wert ist, desto unwahrscheinlicher ist eine zufällige Verteilung der Stichproben zweier Gruppen. Ein p-Wert von ≤ 0.05 wurde in dieser Arbeit als signifikant definiert (* = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$).

Ein geeigneter Biomarker muss zwei Gruppen voneinander unterscheiden können. Die relative Häufigkeit der richtig positiven Ergebnisse wird als Sensitivität bezeichnet und die relative Häufigkeit der falsch positiven Ergebnisse als 1-Spezifität. Trägt man diese beiden Parameter gegeneinander auf, so erhält man eine „Receiver Operating Characteristic (ROC)“ Kurve. Ein geeigneter Biomarker hat eine hohe Sensitivität (wahr positiv) und eine kleine 1-Spezifität

(falsch positiv). Anhand dieser ROC-Kurve kann der optimale „cut-off“ Wert als Diskriminanzschwelle abgelesen werden. Er bezeichnet den Wert des zu testenden Biomarkers, an dem jeder Wert am besten seiner Gruppe zugeordnet werden kann, es also wenig falsch positive und am meisten wahr positive Ergebnisse gibt. Darüber hinaus gibt die Fläche unter der Kurve (=area under the curve, AUC) die Güte des Testes an.

4 Ergebnisse

Die transkriptionelle Regulierung von TOAG-1 zeigte bereits im Nierentransplantations-Modell der Ratte eine potentielle Eignung für die Überwachung des Erfolgs immunmodulatorischer Therapien. Das bisher funktionell unbekannte TOAG-1 wurde daher in dieser Arbeit funktionell charakterisiert. Weiterhin wurde die Wirkung von Alefacept, einem immunomodulatorischen Medikament, auf mehrere Faktoren einschließlich der transkriptionellen Regulierung von TOAG-1 *in vitro* untersucht. Zusätzlich wurde eine Studie mit Psoriasis-Patienten durchgeführt, die mit Alefacept behandelt wurden. Der Therapieerfolg sollte anhand der transkriptionellen Regulierung unter anderen von TOAG-1 in PBMCs der Patienten antizipiert werden, um die Eignung dieses Gens als Biomarker zu evaluieren.

Daher kann man diese Arbeit in drei Abschnitte unterteilen: die funktionelle Charakterisierung von TOAG-1, die Wirkmechanismen von Alefacept *in vitro* in Bezug auf die TOAG-1 Regulation und die Alefacept Studie mit Psoriasis Patienten.

4.1 Funktionelle Charakterisierung von TOAG-1

Da die Aminosäuresequenz von TOAG-1 keine Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen oder Peptiden aber ein mitochondriales Sortierungssignal aufzeigte, war das erste Ziel, das TOAG-1 Protein innerhalb der Zelle zu lokalisieren. Die subzelluläre Lokalisation von TOAG-1 war richtungweisend für die weiteren Analysen.

4.1.1 Lokalisation von TOAG-1 in NIH-3T3-Zellen

Das murine TOAG-1 wurde zur subzellulären Lokalisation seines Proteins N-terminal in den pEGFP-N1 Vektor kloniert. Dafür wurde das Stopcodon von TOAG-1, bereits beschrieben (3.2.1.6), entfernt und somit ein Fusionsgen aus TOAG-1 und GFP konstruiert. Nach Transfektion eukaryotischer Zellen mit dieser Plasmid-DNS sollte das Fusionsprotein aus TOAG-1 und EGFP prozessiert und über sein Sortierungssignal zu seinem Bestimmungsort transportiert werden, wo es grün fluoreszieren sollte. Zu diesem Zweck wurden NIH-3T3-Zellen mit dem Plasmid, welches das Fusionprotein codiert, mittels Roti-fect transfiziert. NIH-3T3 ist eine Mausfibroblasten Zelllinie, die sehr gut für Transfektionsexperimente geeignet ist. Als Kontrolle wurden weitere NIH-3T3-Zellen mit dem pEGFP-N1-Vektor ohne TOAG-1 Insert transfiziert, um einen eventuellen Einfluss des Reportergens EGFP auf die subzelluläre Lokalisation abzuklären.

Da das Sortierungssignal eine mitochondriale Lokalisation nahe legte, wurden die Mitochondrien mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, dem MitoTracker® Red angefärbt. Die blaue Dapi Färbung machte die DNS im Zellkern sichtbar und erleichterte somit die Orientierung bezüglich morphologischer Strukturen in der Zelle.

Wie in Abbildung 7 dargestellt ist, zeigten Zellen, die mit dem Fusionsprotein transfiziert wurden, grüne Fluoreszenz in länglichen, organell-ähnlichen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas und nicht im Zellkern.

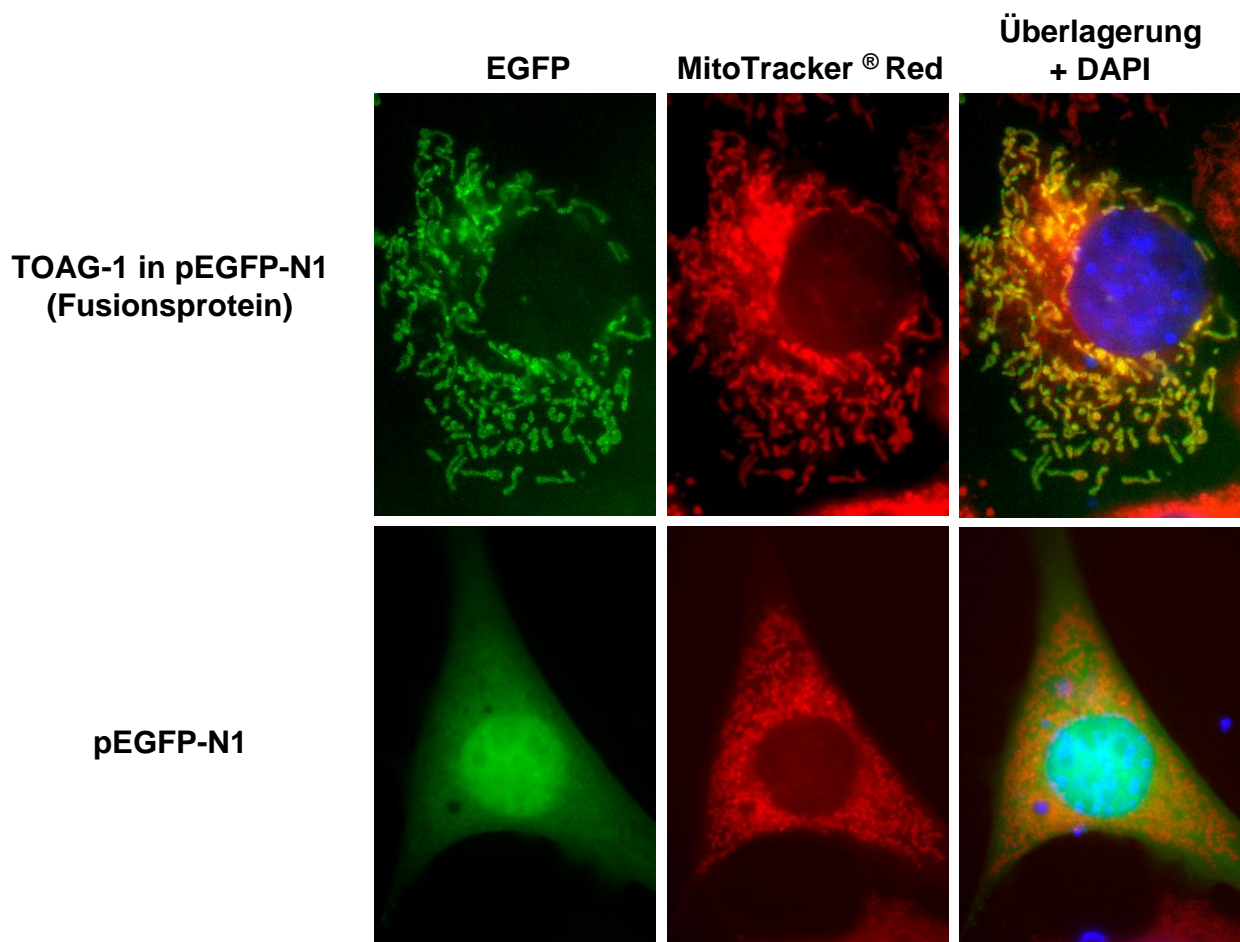


Abbildung 7: MitoTracker® Red Färbung von transfizierten NIH-3T3-Zellen

Die obere Reihe zeigt Aufnahmen von TOAG-1-EGFP (Fusionsprotein) transfizierten Zellen und die untere Reihe von EGFP kontrolltransfizierten Zellen bei den Emissionsmaxima von 488 nm (grün) und 590 nm (rot; MitoTracker Red) sowie in der Überlagerung (von links nach rechts)

Die rote Fluoreszenz derselben Zelle und somit die mitochondrienspezifische Färbung mit MitoTracker® Red, zeigte identische Strukturen. Die Überlagerung beider Fluoreszenzen offenbarte Areale, die gleichzeitig grüne und rote Fluoreszenzen emittieren, als gelb an. Dementsprechend befanden sich das Fusionsprotein und der mitochondrienspezifische Farbstoff im selben Zellkompartiment.

Darüber hinaus zeigt die Abbildung 7 die Kontrolltransfektion einer Zelle mit dem Zielvektor pEGFP-N1 allein, ohne TOAG-1 Insert. Es war deutlich erkennbar, dass die gesamte Zelle grün fluoreszierte, auch der Zellkern. Somit war das Sortierungssignal von TOAG-1 allein für die mitochondriale Lokalisation des Fusionsproteins verantwortlich und EGFP hat darauf keinen Einfluss.

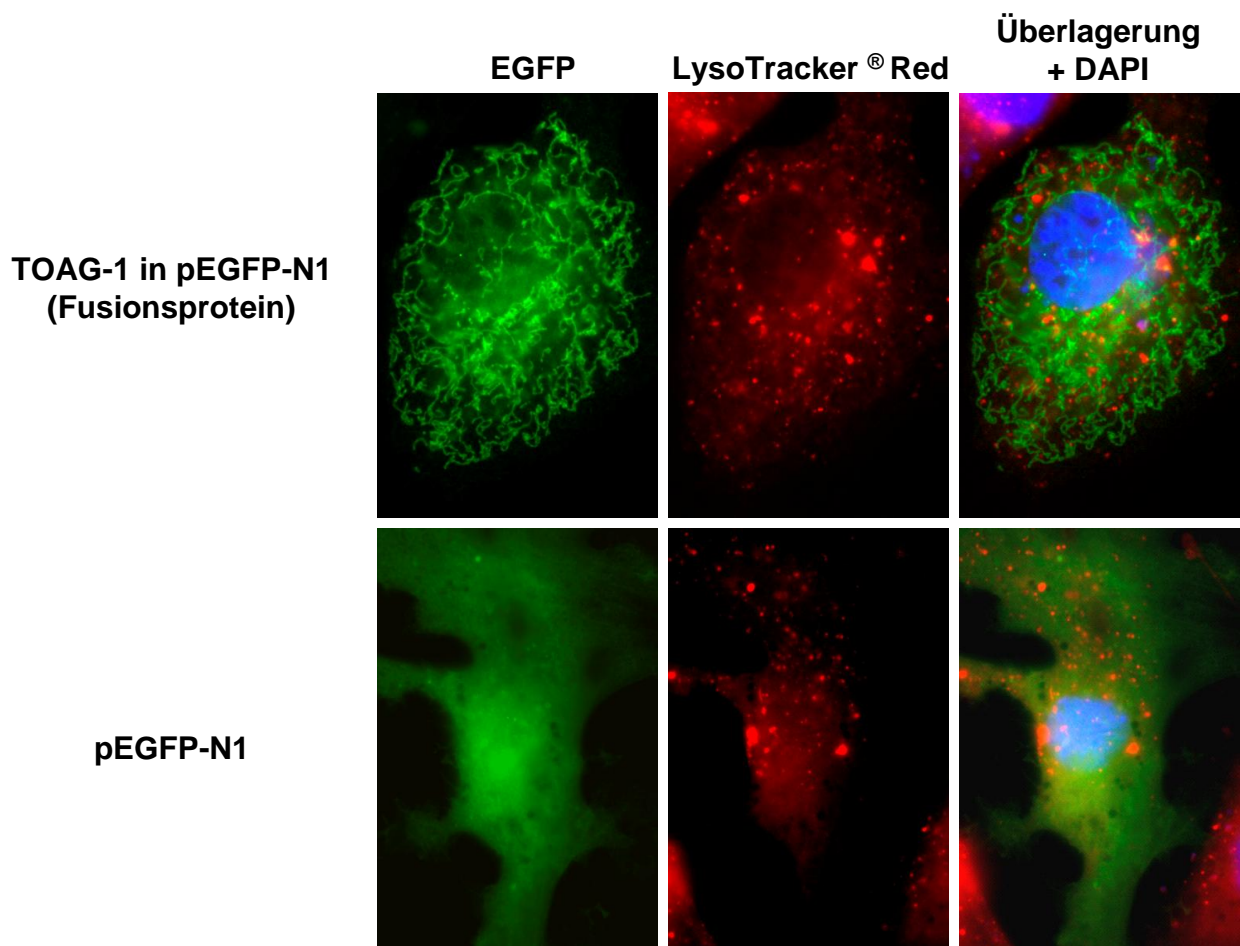


Abbildung 8: LysoTracker Red Färbung von transfizierten NIH-3T3-Zellen

Die obere Reihe zeigt Aufnahmen von TOAG-1-EGFP (Fusionsprotein) transfizierten Zellen und die untere Reihe von EGFP kontrolltransfizierten Zellen bei den Emissionsmaxima von 488 nm (grün) und 590 nm (rot; LysoTracker Red) sowie in der Überlagerung (von links nach rechts).

Um eine zusätzliche Lokalisation des Fusionsproteins in anderen Zellorganellen auszuschließen, wurden transfizierte Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt, der sich in Zellorganellen mit niedrigem pH-Wert, den Lysosomen, einlagert. Diese LysoTracker® Red-Färbung ist in Abbildung 8 dargestellt. Daraus wurde ersichtlich, dass die rote lysosomale Färbung ein punktuell und somit deutlich unterscheidbares Muster im Vergleich zur grünen Fluoreszenz des Fusionsproteins aufwies. Besonders in der Überlagerung beider Fluoreszenzen wurde deutlich, dass keine Areale gleichzeitig grüne und rote Fluoreszenz emittierten. Daher war das Fusionsprotein nicht in Lysosomen lokalisiert.

Abbildung 8 zeigt ebenfalls die LysoTracker®-Färbung nach Kontrolltransfektion mit pEGFP-N1. Auch hier war EGFP innerhalb der kompletten Zelle sichtbar, unterschied sich aber stark von dem Fluoreszenzmuster, welches das Fusionsprotein oder die LysoTracker®-Färbung hervorriefen.

Somit konnte festgestellt werden, dass TOAG-1 ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert war und nicht in Lysosomen oder im Zellkern.

4.1.2 Einfluss von Immunmodulation auf die TOAG-1-Transkription und das mitochondriale Membranpotential *in vitro*

4.1.2.1 Transkriptionelle Regulierung von TOAG-1

Im Nierentransplantations-Modell der Ratte konnte bereits gezeigt werden, dass ein Abfall der TOAG-1-mRNS-Expression akuter oder chronischer Transplantatabstoßung voranging (44). Immunmodulation mit einem anti-CD4-Antikörper hingegen, verhinderte die Transplantatabstoßung und die transkriptionelle Herabregulation von TOAG-1.

Um zu untersuchen, ob diese Beobachtungen auch *in vitro* zutreffen, wurden allogene aktivierte, primäre CD4⁺ T-Zellen der Maus mit oder ohne monoklonalem anti-CD4-Antikörper (mAk, YTS177.9) behandelt und die mRNS-Expression von TOAG-1 mittels qRT-PCR analysiert.

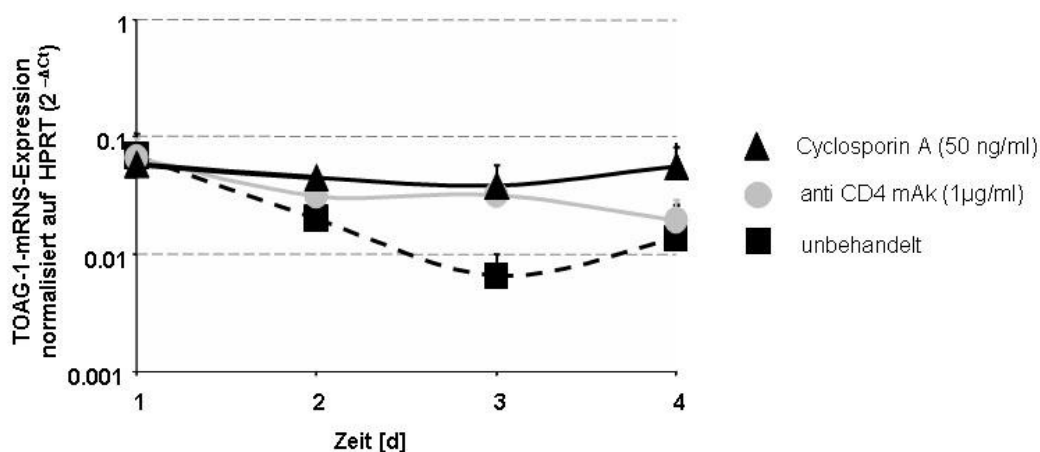


Abbildung 9: TOAG-1-mRNS-Expression während der T-Zellaktivierung

Dargestellt ist die TOAG-1-mRNS-Expression von Splenozyten aus C57 BL6 Mäusen über einen Zeitraum von 4 Tagen nach Stimulation mit allogenen B-Zellen aus Balb/c Mäusen [gestrichelte Linie] und zusätzlicher Behandlung mit anti-CD4-mAk (1 µg/ml) [schwarze Linie] oder Cyclosporin A (50 ng/ml) [graue Linie], Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aller Experimente. n=3

Zusätzlich wurde der Einfluss eines weiteren immunomodulatorischen Medikamentes, dem Cyclosporin A, auf gleiche Weise untersucht. Abbildung 9 zeigt die TOAG-1-mRNS-Expression normalisiert auf HPRT gegen die Zeit. Nach allogener Stimulation von Splenozyten aus der

Maus wurde die TOAG-1-Transkription vermindert. Drei Tage nach Stimulation erreichte die TOAG-1-Expression mit einem zehnfachen Verlust seinen Tiefpunkt.

Diese Herunter-Regulation konnte durch Behandlung der MLC mit einem anti-CD4-mAK abgeschwächt werden und mittels Cyclosporin A sogar komplett verhindert werden.

4.1.2.2 Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass TOAG-1 ein mitochondrial lokalisiertes Protein ist (4.1.1) und seine mRNS-Expression durch Immunmodulation während T-Zellaktivierung beeinflussbar war (4.1.2). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) durch Immunmodulation verändert wird. Hierzu wurden unbehandelte und Zellen einer anti-CD4-mAK behandelten MLC (siehe oben) am Tag 4 nach Stimulation für die durchflusszytometrische Analyse geerntet und mit TMRM (Tetramethylrhodamin-methyl-ester) gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential ein. Zellen mit niedrigem mitochondrialen $\Delta\Psi_m$ werden weniger stark angefärbt. In Abbildung 10 ist als Histogramm veranschaulicht, dass allogene aktivierte, primäre CD4⁺ T-Zellen der Maus durch Immunmodulation mittels anti-CD4-mAK tatsächlich ein geringeres mitochondriales $\Delta\Psi_m$ zeigen, als unbehandelte allogene aktivierte CD4⁺ T-Zellen. Es lagen 50 % der anti-CD4 mAK behandelten CD4⁺ T-Zellen in der Region 1 (R1). Im Gegensatz dazu zeigten nur zu 30 % der unbehandelten T-Zellen ein verringertes mitochondriales Membranpotential.

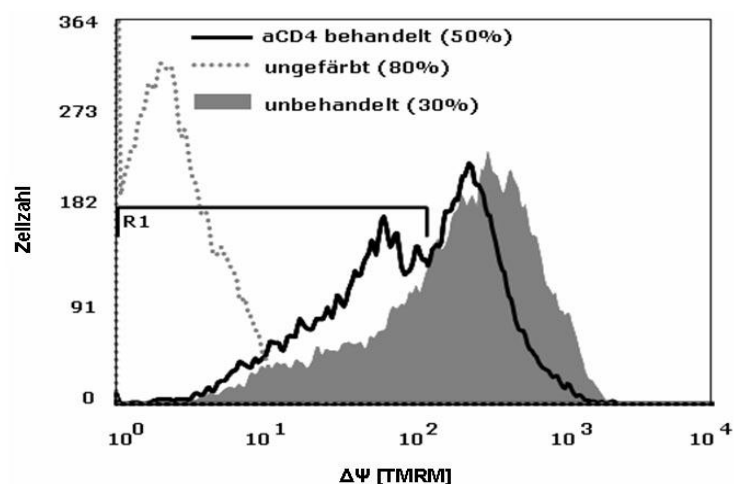


Abbildung 10: Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) von aktivierten, murinen CD4⁺ T-Zellen

Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm der Aufnahme von TMRM in die mitochondriale Membran [Gesamt n=2]. Sie wurde durchflusszytometrisch am Tag 4 einer anti-CD4-mAK (1 µg/ml) behandelten MLC [schwarze Linie] und einer unbehandelten MLC [graue Fläche] gemessen.

Diese Ergebnisse weisen auf einen eventuellen Zusammenhang zwischen TOAG-1 und dem mitochondrialen Membranpotential hin.

4.1.3 Überexpression von TOAG-1 mittels retroviralem Gentransfer

Ziel des retroviralen Gentransfers war es, den Einfluss einer verstärkten TOAG-1-Expression zu analysieren und Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion dieses Gens zu ziehen. Primärzellen sind empfindlicher als etablierte Zelllinien. Daher sind die Verfahren zur Transfektion von Zelllinien hier nur begrenzt anwendbar. Sie führen entweder aufgrund ihrer Aggressivität bzw. Toxizität zum Tod der Primärzellen, oder erreichen keine ausreichende Transfektionseffizienz. Deshalb wurde die Überexpression von TOAG-1 durch retroviralen Gentransfer realisiert. Der verwendete retrovirale Vektor pLXSN-IRES-GFP trägt als Reportergen das GFP. Daher war eine durchflußzytometrische Bestimmung von erfolgreich infizierten Zellen möglich.

CD4⁺ T-Zellen aus C57/BL6 Mäusen wurden isoliert, mittels der anti-murinen CD3/CD28-Antikörper voraktiviert und am nächsten Tag mit dem jeweiligen Virus-infiziert. Fünf Tage nach Infektion wurden die primären T-Zellen durchflußzytometrisch bezüglich ihrer Transduktionseffizienz, Apoptoseneigung und mitochondrialem Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) analysiert. Zusätzlich wurde der Überstand hinsichtlich der Zytokinproduktion, ebenfalls mittels Durchflußzytometrie, untersucht.

4.1.3.1 Herstellung der TOAG-1-Viruspartikel und Kontrolle ihre Infektiosität

Zum Zweck der Überexpression wurde der codierende Bereich von TOAG-1 in den retroviralen Vektor, pLXSN-IRES-GFP, wie bereits beschrieben (3.2.1.7), kloniert. Ob die Transfektion von HEK-293-Zellen mit den retroviralen Vektorkonstrukten zur Produktion funktionaler TOAG-1-Viruspartikel führte, wurde durch Zugabe des, aus der Transfektion gewonnenen, Zellkulturüberstands zu NIH-3T3-Zellen geprüft. In Abbildung 11 ist eine durchflußzytometrische Bestimmung der GFP-Transduktionseffizienz in NIH-3T3-Zellen, beispielhaft dargestellt.

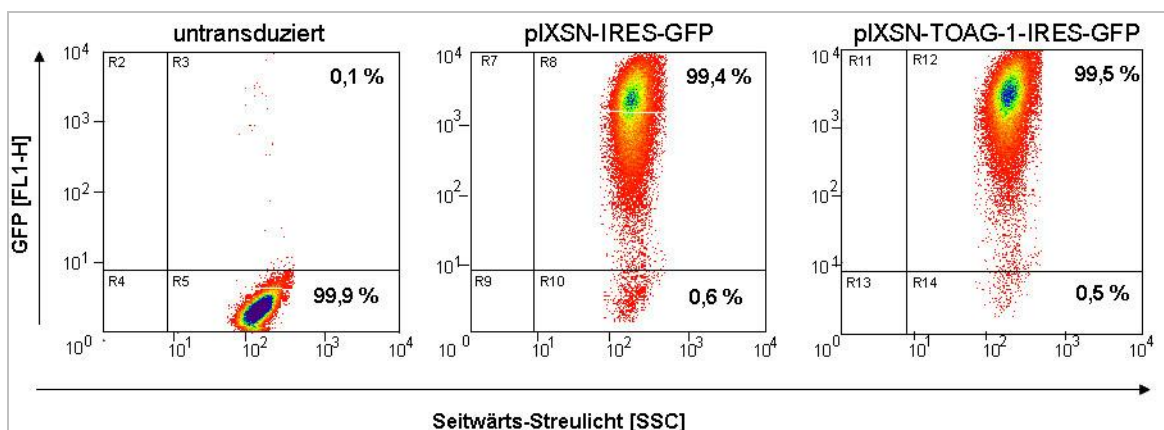


Abbildung 11 Durchflußzytometrische Bestimmung der Transduktionseffizienz in NIH-3T3-Zellen.

Dargestellt ist je ein repräsentativer Dotplot der GFP-Expression am Tag 3: ohne Virus, nach Infektion mit Kontroll-GFP-Virus oder TOAG-1-GFP-Virus (n= 3)

Drei Tage nach Zugabe des Zellkulturüberstands aus der Transfektion waren mehr als 99 % der NIH-3T3-Zellen Fluoreszenz-1 und somit GFP positiv. Wohingegen nur 0,1 % der uninfizierten Zellen im gleichen Quadranten lagen. Sowohl TOAG-1-GFP als auch Kontroll-GFP-Viren waren demnach in der Lage, NIH-3T3-Zellen sehr effizient zu infizieren und somit die Transkription und Translation von GFP zu induzieren.

Um die Überexpression von TOAG-1 in den infizierten Zellen nachzuweisen, wurde eine TOAG-1 spezifische qRT-PCR durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde aus den Zellen RNS extrahiert und in cDNS umgeschrieben. Die verwendeten Primer und Sonden sind in Material und Methoden aufgelistet. Abbildung 12 zeigt die TOAG-1-mRNS-Expression von Kontroll-GFP-Virus und TOAG-1-GFP-Virus-infizierten Zellen.

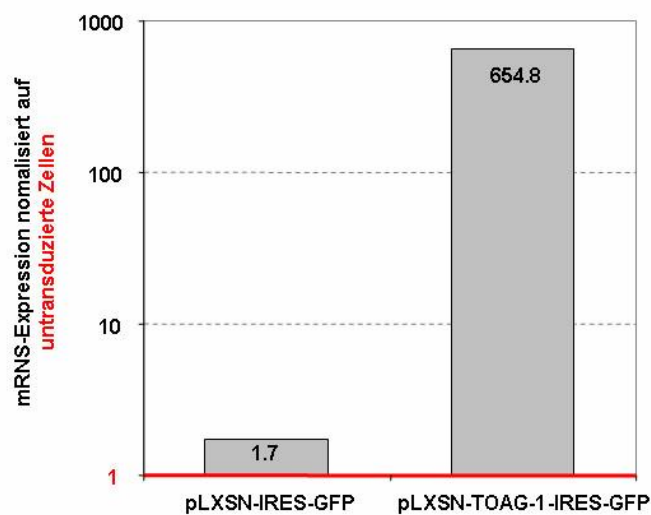


Abbildung 12: mRNS-Expression von TOAG-1 in NIH-3T3-Zellen nach Virusinfektion

Dargestellt ist die TOAG-1-Expression von NIH-3T3-Zellen ermittelt anhand von qRT-PCR 5 Tage nach Infektion mit Kontroll-GFP-Virus bzw. TOAG-1-GFP-Virus. Die Werte wurden auf die TOAG-1-Expression untransduzierter NIH-3T3-Zellen normalisiert (rote Linie = 1); n= 1

Zur Normalisierung wurde die TOAG-1-mRNS-Expression von untransduzierten Zellen verwendet und mit eins gleichgesetzt. Die Werte der virusinfizierten Zellen wurden darauf bezogen. Das TOAG-1-GFP-Virus war demnach geeignet, die mRNS-Expression von TOAG-1 gegenüber untransduzierter Zellen zu erhöhen (654,8-fach). Das Kontroll-GFP-Virus führte zu einer leichten Erhöhung der TOAG-1-mRNS-Expression (1,7-fach) gegenüber nicht transduzierter Zellen. Das TOAG-1-GFP-Virus war demzufolge in der Lage, NIH-3T3-Zellen effizient zu infizieren. Darüber hinaus konnte gesteigerte Transkription von TOAG-1 auf mRNS-Ebene nach Infektion mit dem TOAG-1-GFP-Virus nachgewiesen werden.

4.1.3.2 Transduktionseffizienz von primären murinen CD4⁺ T-Zellen

Die Transduktionseffizienz wurde auch in den primären T-Zellen durchflusszytometrisch über das Reportergen GFP bestimmt. Die Zellen wurden zusätzlich auf die Lymphozytenpopulation eingegrenzt und dann die Fluoreszenz-1 der GFP-Expression gegen das Seitwärts-Streulicht (SSC-H) sichtbar gemacht. Dies ist in Abbildung 13 exemplarisch dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Effizienz der GFP Transduktion des TOAG-1-GFP-Virus mit 18 % sehr viel niedriger ausfiel, als zuvor in den NIH-3T3-Zellen. Das Kontroll-GFP-Virus erreichte durchschnittlich eine Effizienz von 8 % Transduktion in primären T-Zellen aus der Maus.

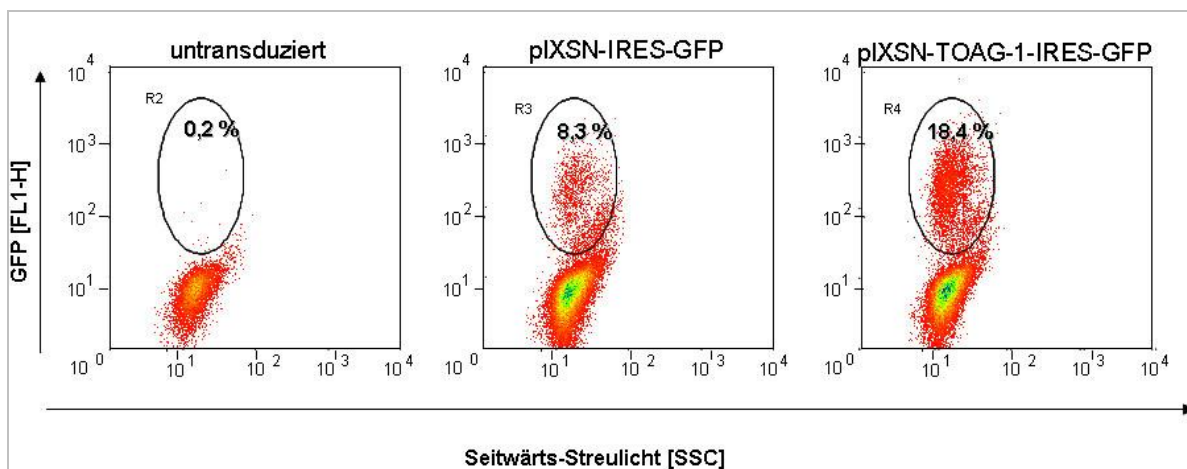


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Bestimmung der Transduktionseffizienz in primären CD4⁺ Zellen der Maus.

Dargestellt ist je ein repräsentativer Dotplot der GFP-Expression am Tag 5: ohne Virus, nach Infektion mit Kontroll-GFP-Virus oder TOAG-1-GFP (n= 3)

In allen nachfolgenden Experimenten mit virusinfizierten, primären T-Zellen der Maus wurden die Zellen nach diesem Schema (Abbildung 13) eingegrenzt und anschließend die weiteren Färbungen in Histogrammen dargestellt.

4.1.3.3 Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)

Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch Immunmodulation mit einem anti-CD4-Antikörper ein Absinken der TOAG-1-mRNS-Expression nach T-Zellaktivierung abgeschwächt werden konnte. Zusätzlich wurde durch die *in vitro* Behandlung mit diesem anti-CD4-mAk ein herabgesetztes $\Delta\Psi_m$, im Gegensatz zu unbehandelten T-Zellen, beobachtet. Um einen eventuellen Zusammenhang vom mitochondrial lokalisierten Protein TOAG-1 und dem $\Delta\Psi_m$ zu untersuchen, wurden murine CD4⁺ T-Zellen mit TOAG-1-GFP-Virus bzw. Kontroll-GFP-Virus infiziert und bezüglich ihres $\Delta\Psi_m$ verglichen. Hierfür wurden die Zellen 5 Tage nach Infektion mit dem rot fluoreszierenden und membranpotentialabhängigen Farbstoff TMRM gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 14 A

dargestellt. TOAG-1-GFP-Virus-infizierte und somit TOAG-1 überexprimierende T-Zellen zeigen ein deutlich reduziertes mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) im Gegensatz zu Kontroll-GFP-Virus-infizierten $CD4^+$ T-Zellen. Während nur 22 % der Kontroll-infizierten Zellen in Region 1 (R1) lagen, zeigten 40 % der TOAG-1 überexprimierenden $CD4^+$ Zellen ein vermindertes mitochondriales Membranpotential.

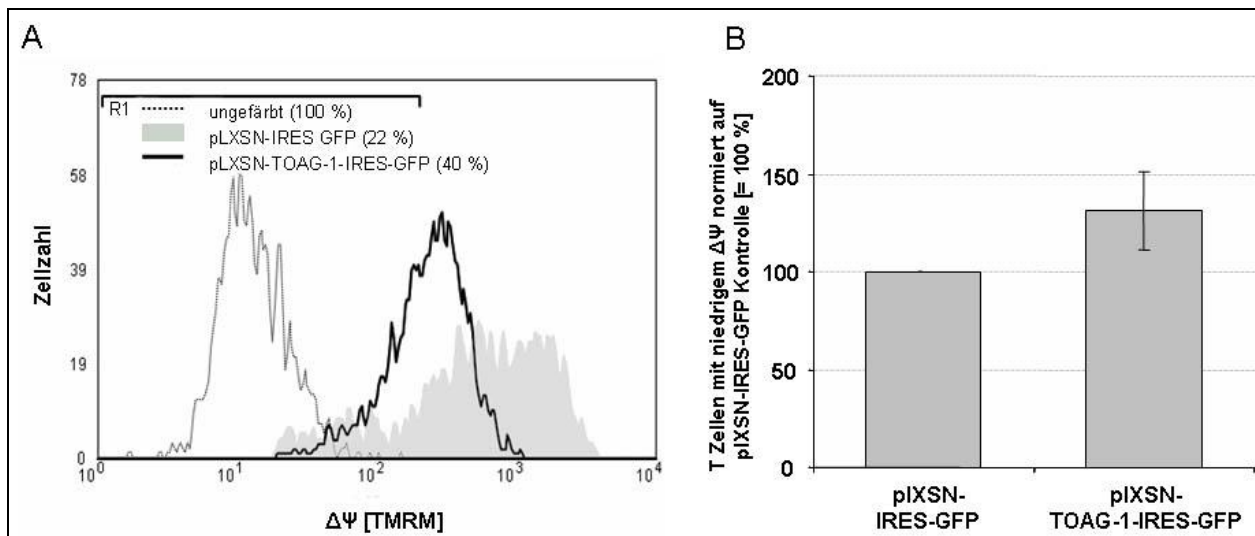


Abbildung 14: Mitochondriales Membranpotential 5 Tage nach Infektion von primären $CD4^+$ Zellen der Maus mit TOAG-1GFP bzw. Kontroll-GFP-Virus

A. Darstellung einer repräsentativen durchflusszytometrischen Messung des mitochondrialen Membranpotentials im Histogramm anhand der Aufnahme von TMRM in die mitochondriale Membran [gepunktet: ungefärbt; graue Fläche: Kontroll-GFP-Virus; schwarze Linie: TOAG-1-GFP-Virus]; **B.** Zusammenfassung aller durchgeführten TMRM Messungen 5 Tage nach Infektion [$n=3$]. Die Messung des Membranpotentials nach Infektion mit Kontroll-GFP-Virus wurde hierzu auf 100 % gesetzt und die Werte vom TOAG-1 GFP-Virus darauf bezogen.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse, in Abbildung 14 B dargestellt, zeigte auf Grund der geringen Endzahl und der hohen Varianzen innerhalb der Messungen sowie zwischen den einzelnen Experimenten keine statistische Signifikanz. Dennoch war der Unterschied in allen unabhängig voneinander durchgeführten ($n = 3$) Virusinfektionen mit anschließender Messung des $\Delta\Psi_m$ offensichtlich.

4.1.3.4 Programmierter Zelltod (Apoptose)

Die Depolarisation der mitochondrialen Membran ist ein sehr frühes aber unspezifisches Anzeichen der Induktion einer apoptotischen Kaskade. Da TOAG-1 überexprimierende $CD4^+$ T-Zellen ein vermindertes mitochondriales Membranpotential zeigten, lag die Vermutung nahe, dass sie apoptotisch werden. Daher wurden primäre $CD4^+$ T-Zellen der Maus erneut mit TOAG-1-GFP-Virus bzw. Kontroll-GFP-Virus infiziert und hinsichtlich ihrer Apoptoseeigung untersucht. Hierfür wurden die Zellen 5 Tage nach Infektion mit Annexin-V-PE gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, welches während der

frühen Apoptose an die Membranaußenseite der Zelle transloziert wird. Abbildung 15 A zeigt die Ergebnisse exemplarisch in einem Histogramm und Abbildung 15 B eine Zusammenfassung aus allen unabhängigen Messungen von Annexin-V-PE nach Infektion.

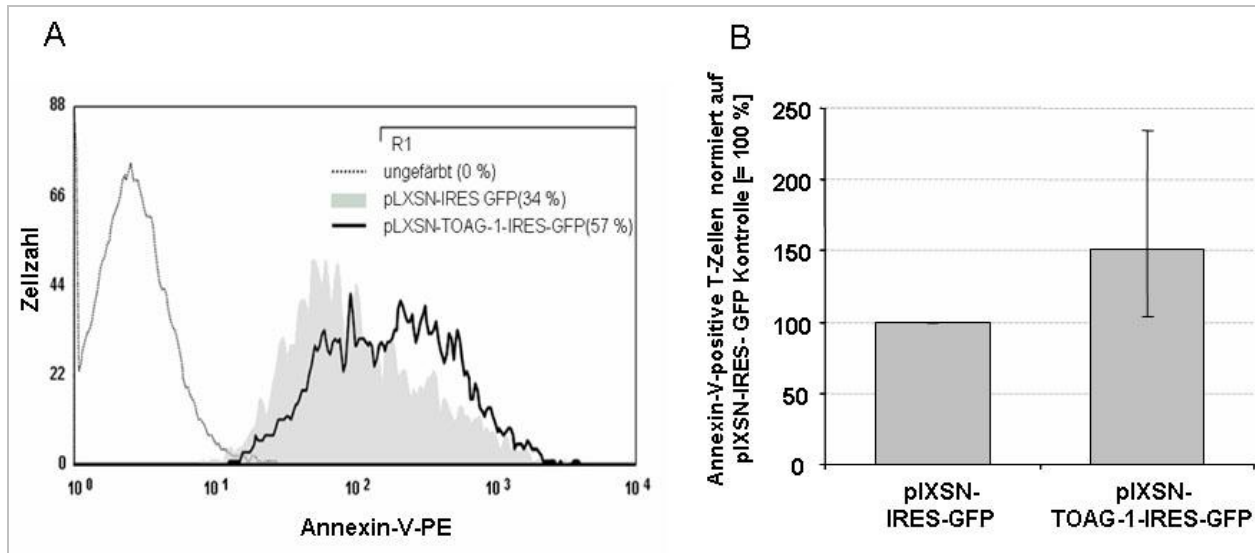


Abbildung 15: Apoptoseneigung nach Infektion von primären CD4⁺ T-Zellen der Maus mit TOAG-1-GFP bzw. Kontroll-GFP-Virus

A. Darstellung einer repräsentativen durchflusszytometrischen Messung der Apoptoseneigung im Histogramm anhand der Bindung von Annexin-V [gepunktet: ungefärbt; graue Fläche: Kontroll-GFP-Virus; schwarze Linie: TOAG-1-GFP-Virus]; **B.** Zusammenfassung aller durchgeführten Annexin-V Messungen 5 Tage nach Infektion [n=3]. Die Messung der Apoptoseneigung nach Infektion mit Kontroll-GFP-Virus wurde hierzu auf 100 % gesetzt und die Werte vom TOAG-1 GFP-Virus darauf bezogen.

Im Beispielhistogramm der Abbildung 15 A lagen 57 % der TOAG-1-GFP-Virus-infizierte Zellen in Region 1, die Annexin-V-PE positive Zellen beschreibt. Im Gegensatz dazu waren nur 34 % der Kontroll-GFP-Virus-infizierten-Zellen in Region 1 lokalisiert und somit Annexin-V-PE positiv. Dementsprechend zeigten TOAG-1 überexprimierende CD4⁺ T-Zellen tatsächlich eine erhöhte Apoptoseneigung gegenüber Kontroll-infizierten CD4⁺ T-Zellen. Dieser Trend war in allen Annexin-V-PE Messungen [n = 3] nach Infektion sichtbar, wie in Abbildung 15 B dargestellt. Aufgrund der niedrigen n-Zahl ergab dies keine statistische Signifikanz.

4.1.3.5 Zytokinfreisetzung

Nach Infektion primärer Maus CD4⁺ T-Zellen mit TOAG-1-GFP-Virus oder Kontroll-GFP-Virus wurden die Kulturüberstände zusätzlich auf ihren Zytokingehalt untersucht. Dies erfolgte mit dem TH1/TH2 Cytometric Bead Array (CBA) von Bender MedSystems®. Dieses Kit ermöglicht die gleichzeitige durchflusszytometrische Bestimmung mehrerer Interleukine (IL-1 alpha, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-17) sowie IFN γ , TNF α und GM-CSF. Zytokine sind Mediatoren, deren Ausschüttung zahlreiche Reaktionen hervorrufen. Daher können Unterschiede in Menge und Art der Zytokine, die nach Überexpression von TOAG-1 sezerniert werden,

ebenfalls Aufschluss über dessen Funktion geben. Hierfür wurden die Überstände am Tag 5 nach Infektion abgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Überstände von drei unabhängigen Infektionen wurden parallel in Doppelbestimmungen nach Herstellerangaben markiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten zusätzlich untransduzierte Zellen, deren Zytokingehalt im Überstand als 1 definiert wurde. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen der Überstände von infizierten Zellen wurden darauf bezogen.

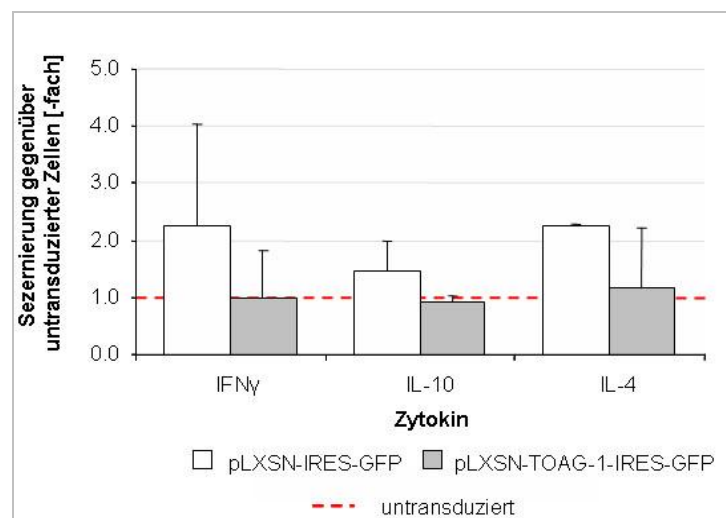


Abbildung 16: Gesamtausschüttung von Zytokinen infizierter primärer CD4⁺ T-Zellen der Maus im Vergleich zu nicht infizierten Zellen

Die Zytokinfreisetzung 5 Tage nach Infektion mit TOAG-1-GFP-Virus [graue Balken] oder Kontroll-GFP-Virus [weiße Balken] wurde durchflusszytometrisch mit dem TH1/TH2 Cytometric Bead Array der Firma Bender bestimmt [n = 3]. Die Zytokinfreisetzung von untransduzierten Zellen [rote Line =1] wurde dabei auf 1 gesetzt und die Werte der jeweiligen Virusinfektion darauf bezogen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Daraus wurde deutlich, dass die Freisetzung von Zytokinen generell durch eine Transduktion gesteigert wurde, wie in Abbildung 16 dargestellt ist. Es wurden nur die Zytokine aufgetragen, deren Konzentration die untere Nachweisgrenze des Kits überschritt. Dies war bei Interferon gamma (IFN γ), Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10) der Fall. Die Überstände von TOAG-1 transduzierten Zellen zeigten ein ähnliches Zytokinkonzentrationsniveau wie die Überstände untransduzierter Zellen. Daraus folgt, dass das TOAG-1 Virus den induzierenden Effekt, den Retroviren auf die Produktion aller drei nachweisbaren Zytokine hatte, auf das Niveau von untransduzierten Zellen reduzierte.

4.2 Immunomodulation mit Alefacept *in vitro*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *in vitro* kultivierte primäre CD4⁺ T-Zellen der Maus nach Aktivierung einen drastischen Abfall des TOAG-1-mRNS-Expressionsniveaus aufweisen. Diese Reduktion konnte durch Immunmodulation mit anti-CD4 mAK oder Cyclosporin A über 4 Tage abgemildert und sogar verhindert werden.

Im Folgenden wurde Alefacept, ein weiteres immunomodulatorisches Medikament, im humanen System hinsichtlich seines Einflusses auf die transkriptionelle Regulation von TOAG-1 und anderen Genen untersucht. Zu diesen interessanten Genen zählt RHAMM, der Rezeptor für Hyaluronan-vermittelte Migration und CD69 als Marker für den Aktivierungszustand von T-Zellen. Weiterhin sollte geklärt werden, ob die Immunmodulation mit Alefacept im humanen System ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation beider Gene hat. Daraus könnten sich weitere Rückschlüsse hinsichtlich der Funktion von TOAG-1 ergeben.

4.2.1 Einfluss von Alefacept auf die Proliferation von humanen PBMCs

Für die folgenden Analysen des Einflusses von Alefacept wurde vom murinen in das humane System gewechselt, da Alefacept ein rein humanes Fusionsprotein ist. Zu diesem Zweck wurden PBMCs unterschiedlicher Spender aus humanem EDTA Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert (3.2.4.1). Für den Ansatz einer gemischten Lymphozytenkultur wurden gleiche Teile PBMCs eines Spenders A mit T-Zell-depletierten PBMCs eines weiteren Spenders B ko-kultiviert. Diese allogene Stimulation führt zur Proliferation der T-Zellen von Spender A. Sie kann durch den Einbau eines radioaktiven Nucleosids, dem ³H-Thymidin, in die DNS der Tochterzellen gemessen werden.

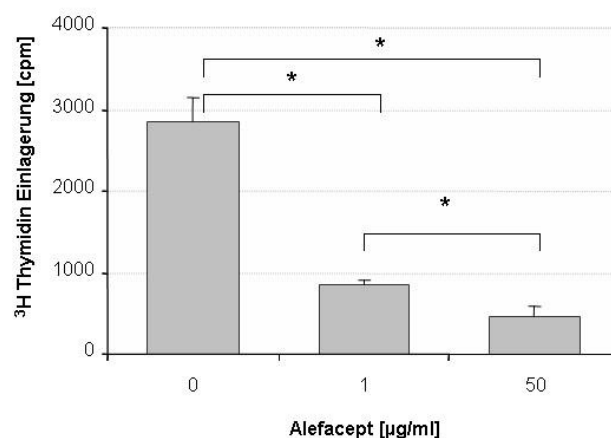


Abbildung 17: Proliferation von humanen PBMCs in Abhängigkeit der Alefacept Konzentration

Die Proliferation wurde durch den Einbau von ³H-Thymidin in die DNS der Tochterzellen bestimmt. Sie wird hier in „counts per minutes“ (cpm) am Tag 4 der gemischten Lymphozyten-Kultur (MLC) angegeben; n = 4; Statistik: * p-Wert < 0,05;

Um zu untersuchen, ob Alefacept eine Reduktion der Zellteilung in humanen T-Zellen bewirkt, wurde eine MLC mit verschiedenen Konzentrationen von Alefacept kultiviert oder unbehandelt belassen wurde. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse dargestellt. Sie zeigen deutlich, dass allogene aktivierte PBMCs weitaus mehr ^3H -Thymidin in ihre DNS aufnahmen, wenn sie nicht mit Alefacept behandelt wurden. Eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Alefacept bewirkte die stärkste Hemmung der Proliferation und wurde im weiteren Verlauf der Arbeit für die *in vitro* Behandlung verwendet. Demnach inhibierte Alefacept die T-Zellteilung nach allogener Stimulation dosisabhängig.

4.2.2 Transkriptionelle Regulation nach Alefacept Behandlung *in vitro*

Zunächst sollte die mRNA-Expression von TOAG-1 und RHAMM während der T-Zellaktivierung in humanen PBMCs aufgeklärt werden. Hierzu wurden erneut PBMCs zweier Spender isoliert, die CD3^+ T-Zellen eines Spenders depletiert und beide ko-kultiviert. Die mRNA-Expression von TOAG-1 und RHAMM wurde über 4 Tage mit qRT-PCR detektiert. Wie in Abbildung 18 dargestellt, war die RHAMM Transkription nach T-Zellaktivierung ca. zehnfach induziert, während die TOAG-1 mRNA um das Zehnfache reduziert wurde. Eine statistische Analyse erfolgte in diesem Vorversuch aufgrund der niedrigen n-Zahl nicht.

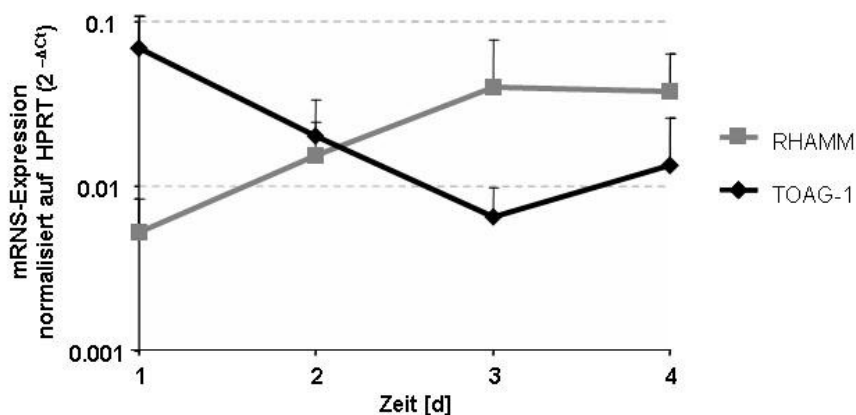


Abbildung 18: Transkriptionelle Regulation von TOAG-1 und RHAMM nach allogener Stimulation humaner PBMCs *in vitro*

Dargestellt ist die mRNA-Expression von TOAG-1 (schwarz) und RHAMM (grau) über die Zeit [d] nach Stimulation humaner PBMCs mit CD3 -depletierten, allogenen PBMCs über die Zeit. $n = 2$

Für die Analyse des Einflusses von Alefacept auf die mRNA-Expression beider Gene wurden weitere Ko-Kulturen entweder ohne Alefacept oder mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Alefacept behandelt. Die Behandlung wurde zusätzlich an 2 verschiedenen Zeitpunkten begonnen: a) am Tag 0, direkt zu Beginn des allogenen Stimulus bzw. b) drei Tage nach erfolgter allogener Stimulation mit T-Zell-depletierten PBMCs. Diese Vorgehensweise sollte zeigen, ob Alefacept während des

Aktivierungsprozesses der T-Zellen die mRNA-Expression von TOAG-1 und RHAMM beeinflusst oder auch nach bereits erfolgter Aktivierung. Die Kulturen wurden am Tag 4 bezüglich der mRNA-Expression beider Gene analysiert. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse dargestellt. Wurde Alefacept zusammen mit dem allogenen Stimulus am Tag 0 zugegeben, so war sowohl die TOAG-1-Induktion ($p=0,018$), als auch die RHAMM-Reduktion ($p=0,015$) auf mRNA-Ebene, statistisch signifikant verschieden von den unbehandelten Kontrollen.

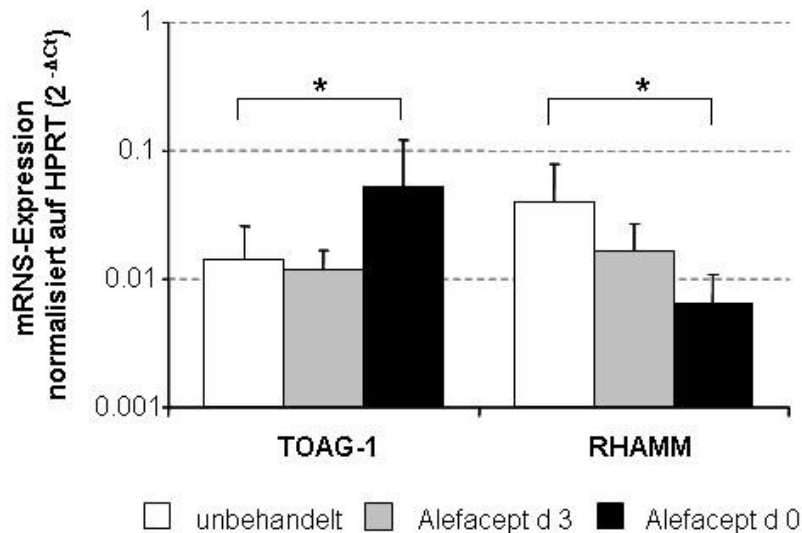


Abbildung 19: mRNA-Expression von nach Alefacept-Behandlung *in vitro*

Dargestellt ist die mRNA-Expression von TOAG-1 und RHAMM am Tag 4 nach Stimulation von PBMCs mit allogenen T-Zell-depletierten PBMCs eines zweiten Spenders. Die Zugabe von Alefacept erfolgte entweder gleichzeitig mit der allogenen Stimulation [schwarze Balken] oder 3 Tage danach [graue Balken]. Die weißen Balken zeigen die Expression der unbehandelten, allogenen stimulierten Kultur. Statistik: * p -Wert < 0,05 [TOAG-1: $p=0,018$; RHAMM: $p=0,015$] $n=3$

Ähnliche, wenngleich nicht signifikante Unterschiede bezüglich der RHAMM Transkription waren sichtbar, wenn Alefacept 3 Tage nach erfolgter allogener Stimulation zur Kultur gegeben wurde. Auf die TOAG-1-mRNA-Expression hatte die verzögerte Behandlung mit Alefacept keinen Einfluss. Bisher ist beschrieben, dass Alefacept vorwiegend auf memory-T-Zellen wirkt und $CD8^+$ T-Zellen in Ihrer Gesamtheit reduziert (43). Deshalb wurden MLCs untersucht, deren Spender Zellen entweder ausschließlich aus naiven oder memory- $CD4^+$ T-Zellen oder aus $CD8^+$ T-Zellen bestanden. Auch sie wurden mit T-Zell-depletierten PBMCs eines weiteren Spenders stimuliert und in Abwesenheit oder unter Zugabe von Alefacept am Tag 0 oder Tag 3 kultiviert. Am Tag 0 und am Tag 4 wurde neben TOAG-1 und RHAMM auch die mRNA-Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD69 (81) analysiert. Ziel war es, festzustellen, ob die T-Zellsubtypen sich in Ihrer Empfindlichkeit gegenüber Alefacept unterscheiden. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse dargestellt. Interessanterweise zeigten alle drei untersuchten T-Zellsubtypen zu Beginn der Stimulation vergleichbare mRNA-Expressionsniveaus von entweder TOAG-1,

RHAMM oder CD69 (Abbildung 20 A). Auffällig ist die hohe Transkription von CD69. Alefacept hatte auf alle drei untersuchten T-Zellsubtypen einen vergleichbaren Effekt bezüglich der TOAG-1-mRNS-Transkription (Abbildung 20 B). Wurde Alefacept gleichzeitig mit dem allogenen Stimulus am Tag 0 verabreicht, so zeigten sowohl naive und memory CD4⁺ T-Zellen, als auch CD8⁺ T-Zellen eine verstärkte TOAG-1-mRNS-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

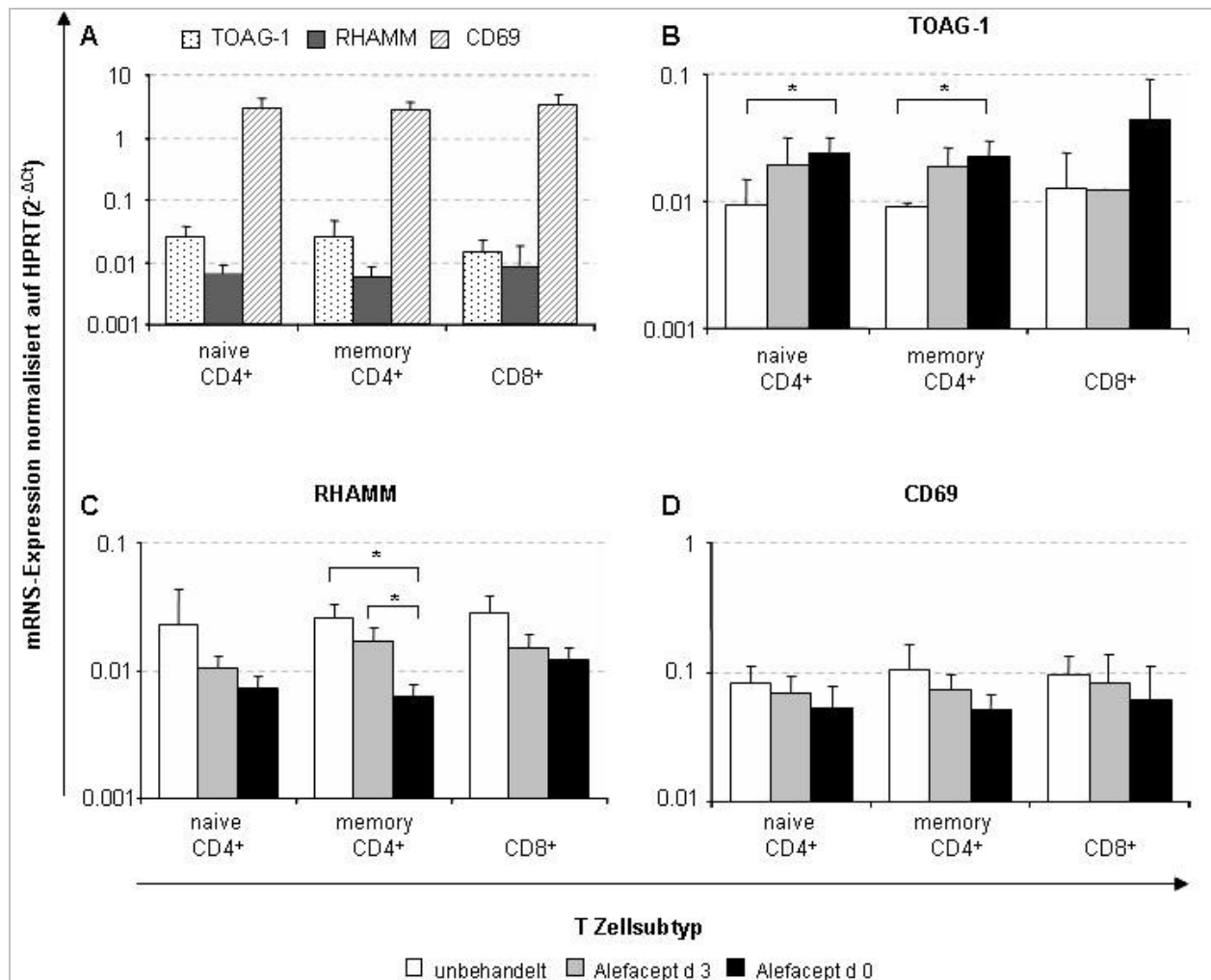


Abbildung 20: mRNS-Expression von TOAG-1, RHAMM und CD69 in unterschiedlichen T-Zellsubtypen
 Dargestellt in **A** ist die mRNS-Expression von TOAG-1 [gepunktet], RHAMM [dunkelgrau] und CD69 [quergestreift] von naiven und memory CD4⁺ T-Zellen sowie CD8⁺ T-Zellen vor der allogenen Stimulation (Tag 0). In **B**, **C** und **D** ist die mRNS-Expression von TOAG-1 [B], RHAMM [C] und CD69 [D] von naiven und memory CD4⁺ T-Zellen sowie CD8⁺ T-Zellen 4 Tage nach Stimulation mit allogenen T-Zell-depletierten PBMCs eines zweiten Spenders dargestellt. Weiße Balken zeigen hierbei die mRNS-Expression allogenen stimulierter aber nicht mit Alefacept behandelte Kulturen. Graue Balken stellen die mRNS-Expression von Kulturen dar, die 3 Tage nach allogener Stimulation mit Alefacept behandelt wurden. Schwarze Balken zeigen die Transkription von Kulturen, die gleichzeitig am Tag 0 allogenen stimuliert und mit Alefacept behandelt wurden. Statistik: * p-Wert < 0,05; n = 3

Diese Erhöhung war in naiven und memory CD4⁺ T-Zellen statistisch signifikant. Aufgrund der hohen Standardabweichung war der Anstieg der TOAG-1-Expression in CD8⁺ T-Zellen nicht signifikant. Es wurde deutlich, dass Alefacept drei Tage nach allogener Stimulation verabreicht,

in CD8⁺ T-Zellen keine gesteigerte TOAG-1-Expression gegenüber unbehandelten Zellen aufwies. Die Transkription von RHAMM hingegen wurde bei analoger Behandlung reduziert und erreichte in memory CD4⁺ T-Zellen ebenfalls statistische Signifikanz. Die Zugabe von Alefacept drei Tage nach allogener Stimulation, bewirkte jeweils eine ähnliche Tendenz bezüglich der RHAMM-mRNS-Expression verglichen mit Alefacept-Zugabe am Tag 0, jedoch ergab dies keine Signifikanz. Die transkriptionelle Regulation von CD69 der verschiedenen T-Zellsubtypen ist in Abbildung 20 D dargestellt. Sowohl am Tag 0 als auch drei Tage später verabreichtes Alefacept hatte nur einen geringfügig reduzierenden Einfluss auf die CD69-mRNS-Expression aller untersuchten T-Zellsubtypen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

4.2.3 Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine *in vitro* Behandlung von primären humanen PBMCs und T-Zellsubtypen mit Alefacept zur verstärkten Transkription von TOAG-1 führte. Da TOAG-1 in Mitochondrien lokalisiert ist und seine Überexpression in primären murinen T-Zellen zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) führte (siehe 4.1.3.3), wurde nun auch der Einfluss von Alefacept auf das $\Delta\Psi_m$ von primären humanen T-Zellen überprüft. Hierzu wurden humane PBMCs isoliert, mittels magnetischer Zellsortierung in naive und memory CD4⁺ T-Zellen sowie CD8⁺ T-Zellen aufgetrennt und nach allogener Stimulation ohne bzw. mit Alefacept am Tag 0 oder am Tag 3 kultiviert. Am Tag 5 wurden die Zellen geerntet, mit anti-human-CD4-FITC beziehungsweise anti-human-CD8-PECy5-Antikörper und Tetramethylrhodamin-methyl-ester (TMRM), wie bereits beschrieben (3.2.2.2), gefärbt. Sofort im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Messung. Die CD4-FITC bzw. CD8-PECy5 positiven Zellen konnten eingegrenzt und deren TMRM-Färbung in der 2. Fluoreszenz dargestellt werden. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse für alle untersuchten T-Zellsubtypen dargestellt. Für jeden T-Zellsubtyp ist ein exemplarisches Histogramm und die Zusammenfassung aller unabhängig voneinander durchgeführten Messungen sowie statistischer Auswertung gezeigt. Vergleicht man alle drei untersuchten Subtypen untereinander bezüglich ihrer TMRM-Färbung nach allogener Stimulation, so fällt auf, dass die Mehrheit der CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 21 A, B) nur schwach TMRM gefärbt wurden. Wohingegen der prozentuale Anteil von schwach TMRM positiven naiven und memory CD4⁺ T-Zellen eher gering ausfiel. Dies weist darauf hin, dass allogenen stimulierten CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen sich in ihrem mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) unterscheiden. Innerhalb der CD8⁺ T-Zellen konnte ein Trend zum Verlust des $\Delta\Psi_m$ nach Alefacept-Behandlung, unabhängig vom Zeitpunkt der

Zugabe (Tag 0 oder Tag 3), identifiziert werden, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Beide Subpopulationen von CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 21 C, D und E, F) zeigten nach allogener Stimulation einen Anteil von ca. 10 % schwach TMRM gefärbter Zellen. Wurden die CD4⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt der allogenen Stimulation (ab Tag 0) mit Alefacept behandelt, so verdoppelte sich der Anteil schwach TMRM gefärbter T-Zellen sowohl in naiven als auch in memory CD4⁺T-Zellen.

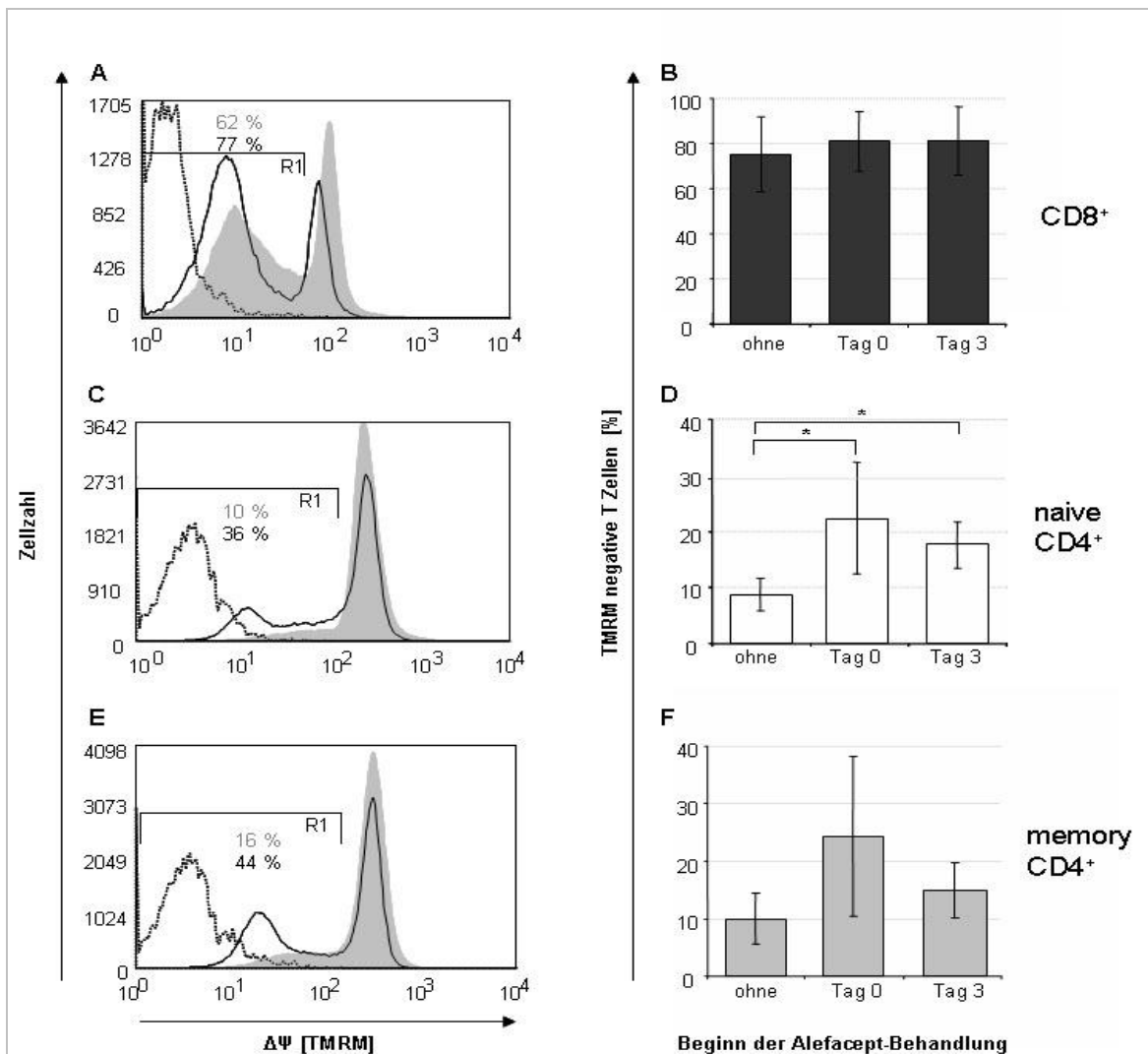


Abbildung 21: Einfluss von Alefacept auf das mitochondriale Membranpotential von humanen allogenen aktivierten T-Zellsubtypen, die mittels magnetischer Zellsortierung isoliert wurden

Dargestellt ist das mitochondriale Membranpotential anhand der Einlagerung des Farbstoffs TMRM in die mitochondriale Membran. **A:** TMRM Histogramm von CD8⁺ T-Zellen nach Eingrenzung auf humane CD8-PECy5 positive T-Zellen 5 Tage nach allogener Stimulation ohne Alefacept (graue Fläche) und mit Alefacept ab Tag 0 (schwarze Linie), sowie TMRM-ungefärbt (gestrichelte Linie). **B:** Zusammenfassung der TMRM Messungen aller unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen von CD8⁺ T-Zellen ohne Alefacept und nach Alefacept-Gabe am Tag 0 bzw. Tag 3 der allogenen Stimulation(n=3). **C:** TMRM Histogramm von naiven CD4⁺ T-Zellen nach Eingrenzung auf humane CD4-FITC positive T-Zellen analog zu 22 A; **D:** Zusammenfassung der TMRM Messungen aller unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen von naive CD4⁺ T-Zellen analog zu 22 B; Statistik: * = p-Wert < 0,05; **E:** TMRM Histogramm von memory CD4⁺ T-Zellen nach Eingrenzung auf humane CD4-FITC positive T-Zellen analog zu 22 A und C; **F:** Zusammenfassung der TMRM Messungen aller (n=3) unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen von memory CD4⁺ T-Zellen analog zu 22 B und D.

Erfolgte die Alefacept-Gabe drei Tage nach der allogenen Stimulation, so war ebenfalls eine prozentuale Zunahme TMRM niedriger T-Zellen erkennbar. Beide Zeitpunkte der Alefacept-Behandlung (Tag 0 und Tag 3) führten in naiven CD4⁺ T-Zellen zu einer statistisch signifikanten Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials gegenüber stimulierten, aber unbehandelten Zellen.

4.2.4 Programmierter Zelltod (Apoptose)

Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ist als ein frühes Anzeichen für eine bevorstehende Apoptose beschrieben. Daher wurde auch die Apoptoseneigung verschiedener T-Zellsubtypen anhand einer Annexin-V Färbung unter Alefacept-Behandlung untersucht. Hierzu wurden erneut aus PBMCs gesunder Spender sowohl naive und memory CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen isoliert. Sie wurden wie zuvor allogenen stimuliert und am Tag 0 oder am Tag 3 mit 50 µg/ml löslichem Alefacept behandelt bzw. unbehandelt belassen. Am Tag 5 wurden die Zellen geerntet, mit anti-human CD4-FITC bzw. anti-human CD8-PECy5-Antikörper und Annexin-V-PE gefärbt (3.2.8.2). Sofort im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Messung. Die CD4-FITC bzw. CD8-PECy5 positiven Zellen konnten eingegrenzt und deren Annexin-V-PE Färbung in der 2. Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. In Abbildung 22 wurde für jeden untersuchten T-Zellsubtyp ein repräsentatives Histogramm und die Zusammenfassung aller unabhängig voneinander durchgeführten Annexin-V-Messungen, sowie die statistische Auswertung, dargestellt.

Sowohl CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 22 A, B) als auch naive (Abbildung 22 C, D) und memory CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 22 E, F) zeigten 5 Tage nach allogener Stimulation ca. 10 -20 % Annexin-V positive und somit apoptotische Zellen. Die Behandlung mit Alefacept führte zu einer Zunahme des programmierten Zelltodes in allen untersuchten T-Zellsubtypen, die in beiden CD4⁺ T-Zellsubtypen signifikant war. Eine Behandlung ab dem Zeitpunkt der allogenen Stimulation am Tag 0, führte in CD4⁺ T-Zellen zu einer Verdopplung des Anteils Annexin-V positiver Zellen. Wurden die Kulturen am Tag 3 mit Alefacept behandelt, so zeigten sie den höchsten Anteil apoptotischer Zellen. CD8⁺ T-Zellen reagierten mit einer Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen, um etwa 10 % im Vergleich zu allogenen stimulierten aber unbehandelten Zellen, unabhängig vom Zeitpunkt der Alefacept-Zugabe.

Somit waren sie weniger anfällig für die Alefacept-induzierte Apoptose, als beide untersuchten CD4⁺ T-Zellsubtypen, sie zeigten jedoch bereits in den unbehandelten Kulturen einen Trend zur erhöhten Apoptoseneigung (siehe Abbildung 22 B).

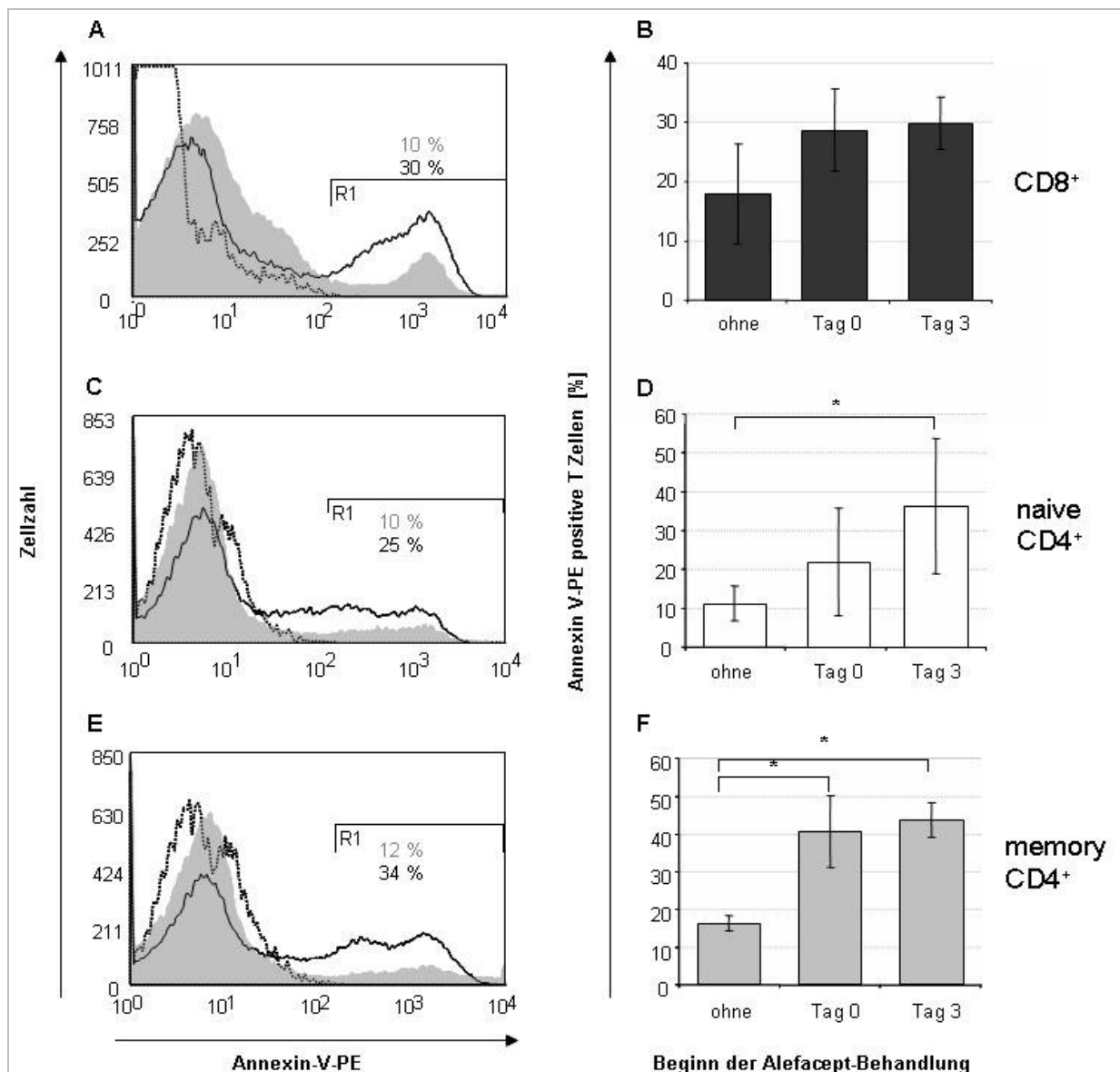


Abbildung 22: Einfluss von Alefacept auf die Apoptoseneigung von humanen allogenen aktivierten T-Zellsubtypen, isoliert mittels magnetischer Zellsortierung.

Dargestellt ist die Apoptoseneigung ermittelt durch Annexin-V-PE Färbung. **A:** Annexin-V-PE Histogramm von CD8⁺ T-Zellen nach Eingrenzung auf humane CD8-PECy5 positive T-Zellen, 5 Tage nach allogener Stimulation ohne Alefacept (graue Fläche) und mit Alefacept ab Tag 0 (schwarze Linie), sowie Annexin-V-PE-ungefärbt (gestrichelte Linie). **B:** Zusammenfassung der Annexin-V-PE Messungen aller unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen von CD8⁺ T-Zellen ohne Alefacept und nach Alefacept-Gabe am Tag 0 bzw. Tag 3 der allogenen Stimulation (n=3). **C:** Annexin-V-PE Histogramm von naiven CD4⁺ T-Zellen nach Eingrenzung auf humane CD4-FITC positive T-Zellen analog zu 23 A; **D:** Zusammenfassung der Annexin-V-PE Messungen aller unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen von naive CD4⁺ T-Zellen analog zu 23 B; Statistik: * = p-Wert < 0,05 (n=3) **E:** Annexin-V-PE Histogramm von memory CD4⁺ T-Zellen nach Eingrenzung auf humane CD4-FITC positive T-Zellen analog zu 23 A und C; **F:** Zusammenfassung der Annexin-V-PE Messungen aller (n=3) unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen von memory CD4⁺ T-Zellen analog zu 23 B und D; Statistik: * = p-Wert < 0,05.

4.2.5 Wirkung von Alefacept in Abwesenheit Antigen-präsentierender Zellen (APZ)

Der Literatur nach beruht die Wirkung von Alefacept, wie bereits eingangs beschrieben, auf zweierlei Prinzipien. Der LFA3-Anteil des Fusionsproteins Alefacept blockiert die CD2-Oberflächenmoleküle auf T-Zellen und unterbindet somit die Ko-Stimulation bei vorhandenen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ). Der zweite Teil von Alefacept ist das Fc-Fragment des humanen IgG1 und wird vom Fc γ Rezeptor III Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) erkannt und gebunden. Daraufhin schütten NK-Zellen Granzym B aus und induzierten so Apoptose in der, über den LFA3 Anteil des Fusionsproteins Alefacept, gebundenen CD2⁺ Zelle. In Anwesenheit von APZ führte Alefacept unter anderem zur Hemmung der Proliferation und zu unterschiedlicher transkriptioneller Regulation von TOAG-1 und RHAMM gegenüber unbehandelten Zellen (4.2.2). Um zu untersuchen, ob Alefacept auch in Abwesenheit von APZ diese Effekte auslöst und somit direkt auf die Zellen wirkt, wurden naive CD4⁺ T-Zellen mit immobilisierten anti-human CD3 und anti-human CD28-Antikörper stimuliert und am Tag 0 mit Alefacept in Lösung oder ebenfalls immobilisiert behandelt. Zwei Tage nach Stimulation der naiven CD4⁺ T-Zellen wurde mittels ³H-Thymidin-Einbau die Proliferation der einzelnen Kulturen bestimmt. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse zusammengefasst dargestellt.

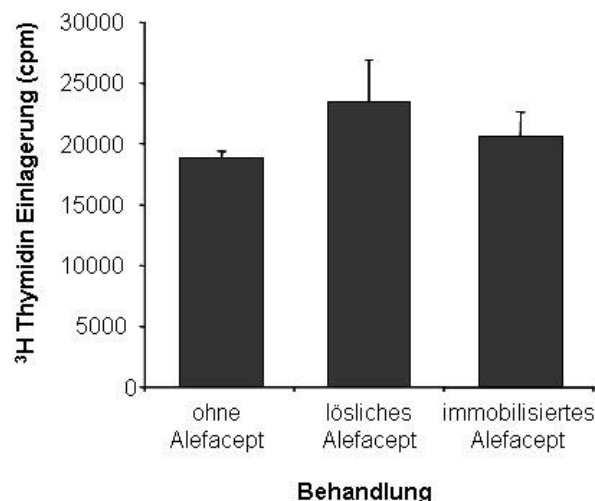


Abbildung 23: Proliferation von allogen stimulierten naiven CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von allogenem APZ

Die Messung der Proliferation anhand von ³H-Tymidin Einlagerung erfolgte zwei Tage nach *in vitro* Stimulation mit immobilisierten anti-human CD3/CD28-Antikörpern ohne und mit Alefacept-Behandlung (löslich oder immobilisiert) [n=3]. Vor der Messung wurden die Zellen 18 h unter Kulturbedingungen mit ³H-Tymidin inkubiert.

Die Proliferation naiver CD4⁺ T-Zellen war nach *in vitro* Stimulation mittels anti-human CD3/CD28-Antikörpern in allen drei Gruppen vergleichbar. Alefacept war unabhängig von der Art der Behandlung, nicht in der Lage die Proliferation gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu hemmen. Auch immobilisiertes Alefacept, welches zeitgleich mit den stimulierenden anti-

humanen CD3/CD28-Antikörpern auf die Zellkulturplatte aufgebracht wurde, hatte keinen hemmenden Effekt auf die Proliferation der naiven CD4⁺ T-Zellen. Zusätzlich wurde in einem identischen Versuchsaufbau mit löslichem Alefacept der Einfluss eines quervernetzenden anti-human IgG1-Antikörper analysiert. Die Proliferation wurde erneut zwei Tage nach *in vitro*-Aktivierung der naiven CD4⁺ T-Zellen mittels anti-humanen CD3/CD28-Antikörpern mit Hilfe der ³H-Thymidin Einlagerung analysiert. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse dargestellt.

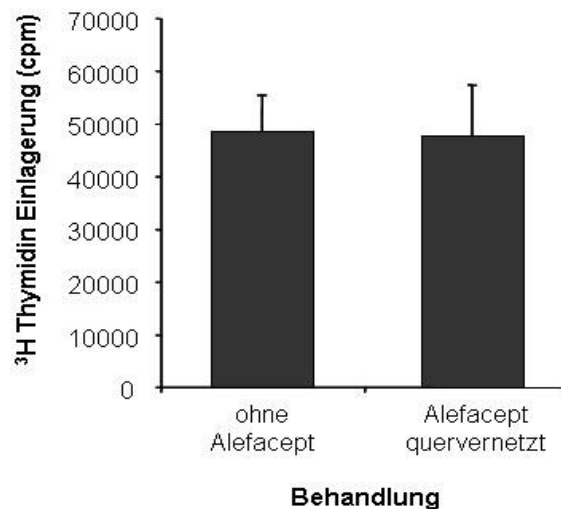


Abbildung 24: Proliferation von naiven allogenen stimulierten CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von allogenen APZ

Die Messung der Proliferation anhand von ³H-Thymidin Einlagerung erfolgte zwei Tage nach *in vitro* Stimulation mit immobilisierten anti-human CD3/CD28-Antikörpern ohne und mit löslichem, mittels anti-human-IgG1-quervernetztem Alefacept [n=3]. Vor der Messung wurden die Zellen 18 h unter Kulturbedingungen mit ³H-Thymidin inkubiert.

Auch die Quervernetzung von Alefacept mit einem anti-human IgG1-Antikörper führte nicht zur Proliferationshemmung nach *in vitro* Aktivierung in Abwesenheit von APZ, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 4.2.2), führte Alefacept in Anwesenheit von allogenen APZ auch zu einer veränderten TOAG-1 und RHAMM-mRNS-Expression. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob dies auch in Abwesenheit von APZ der Fall ist. Hierzu wurden erneut naive CD4⁺ T-Zellen mit anti-human CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit löslichem oder immobilisiertem Alefacept behandelt. Als weitere Kontrolle wurde ein Teil der Zellen unstimuliert belassen. In Abbildung 25 ist die mRNS-Expression von TOAG-1 und RHAMM zwei Tage nach Stimulation und Alefacept-Behandlung dargestellt. Die Stimulation von naiven CD4⁺ T-Zellen mittels anti-humanen CD3/CD28-Antikörpern führte, vergleichbar zur Stimulation mit allogenen APZ (siehe Abbildung 19), zur verringerten TOAG-1 und verstärkten RHAMM-mRNS-Expression in unbehandelten Zellen. Die Behandlung mit Alefacept, sowohl löslich als auch an der Zellkulturplatte immobilisiert, konnte die mRNS-

Expressionsniveaus von RHAMM und TOAG-1 gegenüber den stimulierten aber unbehandelten Zellen nicht verändern

Alefacept war demnach in Abwesenheit von APZ weder in der Lage die Proliferation von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu hemmen, noch deren mRNA-Expressionsniveaus bezüglich RHAMM und TOAG-1 zu verändern, wie es in Anwesenheit von APZ der Fall war.

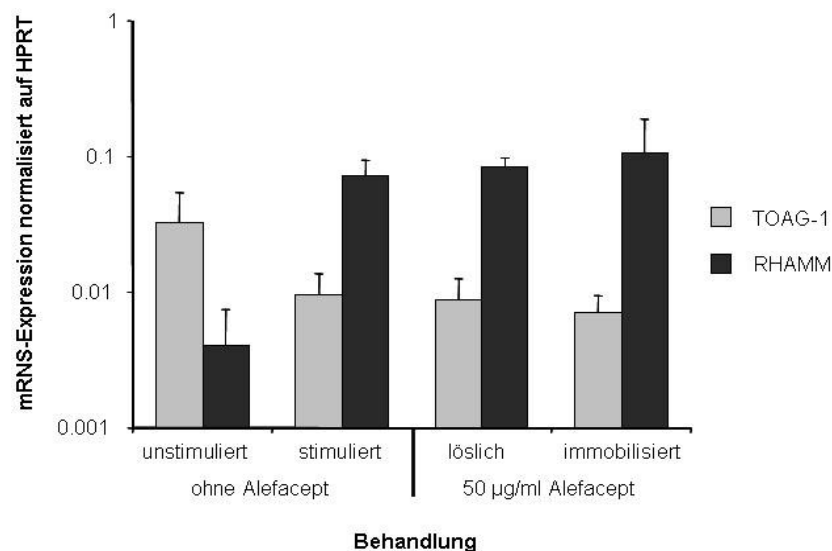


Abbildung 25: mRNA-Expression von naiven $CD4^+$ T-Zellen in Abwesenheit von allogeen APZ.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von TOAG-1 (graue Balken) und RHAMM (schwarze Balken) mit und ohne Alefacept am Tag 2 mit und ohne *in vitro*-Stimulation mit anti-human CD3/CD28-Antikörpern [n=3]

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Wirkung von Alefacept auf einer Interaktion mit allogeen APZ beruht.

4.2.6 Einfluss von Alefacept auf PD-L1

Die Bindung von CD274 bzw. PD-L1 („programmed death ligand“) an PD1 und 2 ist als negative Ko-Stimulation bekannt und hemmt die T-Zellaktivierung. PD-L1 wird in erster Linie auf APZ exprimiert. Da die Wirkung von Alefacept die Anwesenheit von APZ erfordert, wurde weiterhin der Einfluss von Alefacept auf deren PD-L1-Expression untersucht.

Zu diesem Zweck wurden humane PBMCs in An- oder Abwesenheit von löslichem Alefacept mit allogeen CD3-depletierten PBMCs ko-kultiviert. Nach fünf Tagen wurden sie geerntet und ihre PD-L1-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen und APZ durchflusszytometrisch ermittelt. Wie in Abbildung 26 dargestellt, enthielten Alefacept behandelte Kulturen signifikant mehr PD-L1 positive APZ als die unbehandelten Kontrollkulturen.

Die Zugabe von Alefacept konnte ebenfalls den Anteil PD-L1 exprimierender CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen erhöhen.

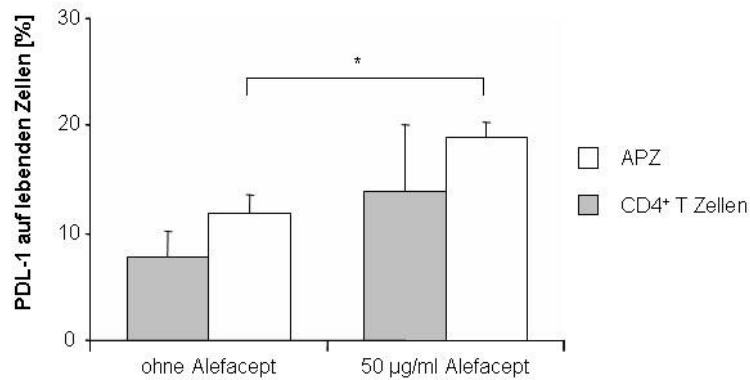


Abbildung 26: PD-L1 Oberflächenexpression mit und ohne Alefacept-Behandlung

Dargestellt ist die PD-L1 Oberflächenexpression auf APZ (weiße Balken) und CD4⁺ T-Zellen (graue Balken) ohne und mit Alefacept-Gabe am Tag 0. Sie wurde durchflusszytometrisch am Tag 5 nach allogener Stimulation ermittelt. CD4⁺ T-Zellen wurden mittels anti-CD4-FITC-Antikörper gefärbt. APZ wurden durch zusätzliche Färbung der CD8⁺ T-Zellen mit anti-CD8-PECy5 als negative Population (CD4⁺/CD8⁻) definiert [n = 3]. Statistik: * = p-Wert < 0,05

Zusätzlich wurde der Einfluss eines neutralisierenden PD-L1-Antikörpers auf die Proliferation nach allogener Stimulation ermittelt. Hierfür wurde die Einlagerung von ³H-Thymidin in Anwesenheit von löslichem Alefacept und zwei verschiedenen Konzentrationen des neutralisierenden anti-PD-L1-Antikörpers analysiert und der Proliferation unbehandelter Zellen gegenüber gestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt und zeigen erneut deutlich, dass Alefacept die Proliferation von PBMCs hemmt.

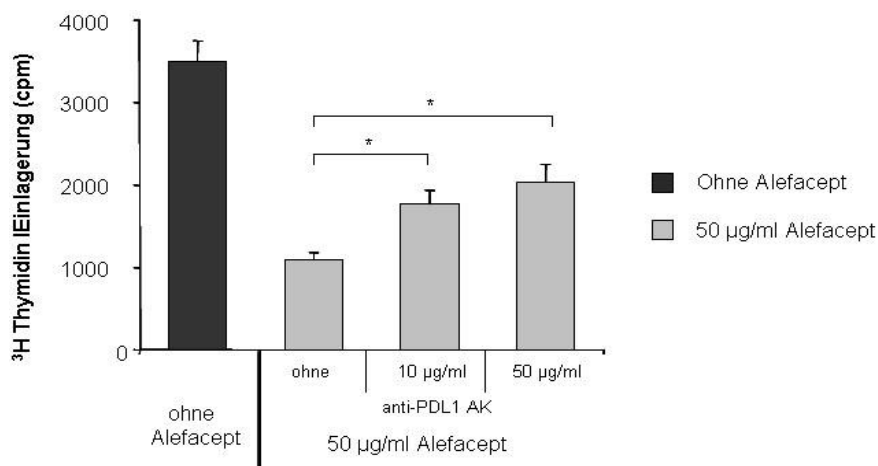


Abbildung 27: Proliferation allogen stimulierter PBMCs in Anwesenheit von löslichem Alefacept und blockierenden anti-PD-L1-Antikörpern

Dargestellt ist die Einlagerung von ³H-Thymidin 4 Tage nach Stimulation mit allogenen, CD3-depletierten PBMCs. Die Kulturen wurden hierfür 18 h unter Kulturbedingungen mit ³H-Thymidin inkubiert [n = 3]. Statistik: * = p-Wert < 0,05

Diese Hemmung konnte durch die Anwesenheit des blockierenden PD-L1-Antikörpers dosisabhängig aufgehoben werden. Eine Konzentration von 10 µg/ml anti-PD-L1-Antikörper in Anwesenheit von Alefacept konnte die Proliferation gegenüber Kulturen ohne anti-PD-L1-Antikörper steigern. Die Zugabe von 50 µg/ml anti-PD-L1-Antikörper verstärkte diesen Effekt weiter.

4.3 Alefacept Studie an Psoriasis-Patienten

Ziel der Alefacept Studie war es, Biomarker für die Therapie von mittelschwerer bis schwerer Psoriasis mit Alefacept zu identifizieren. Hierzu wurde die mRNS-Expression verschiedener potentieller Markergene während der Alefacept-Therapie analysiert. Da TOAG-1 bereits in tierexperimentellen Studien mit anderen immunmodulatorischen Medikamenten und bei der *in vitro* Behandlung mit Alefacept sein Potential als Biomarker gezeigt hat, sollte seine transkriptionelle Regulation während dieser Studie mit Psoriasis Patienten ebenfalls untersucht werden.

In die Studie wurden 20 statistisch ausgewogene Patienten mit mittlerer bis schwerer Psoriasis, die durch einen „Psoriasis Area and Severity Index“ (PASI) von 7-36 gekennzeichnet waren, aufgenommen. Sie wurden wöchentlich über einen Zeitraum von 12 Wochen mit 1x 15 mg Alefacept i. m. behandelt. Die erste Injektion von Alefacept wurde in Woche 0 verabreicht. Den Patienten wurde anfangs ebenfalls wöchentlich und später alle zwei Wochen Blut abgenommen und zusätzlich die Entwicklung der Psoriasis-symptome anhand des PASI eingeschätzt. Eine erfolgreiche Therapie lag vor, wenn eine Reduktion des PASI um mindestens 50 % innerhalb dieser 12 Wochen gegenüber dem initialen PASI vor Therapiebeginn erreicht wurde.

4.3.1 Therapieerfolg der Alefacept-Studie

In unserer Studie reagierten 9 von 20 Patienten mit einer Reduktion von mindestens 50 % des PASI gegenüber ihrem jeweiligen Anfangswert und wurden somit als erfolgreich therapiert angesehen. Dementsprechend reagierten 11 Patienten nur unzureichend auf die Alefacept-Therapie. In Tabelle 6 sind die demographischen Daten aller Patienten aufgelistet. Sie beinhaltet Geschlecht, Alter und den PASI vor Therapiebeginn sowie die maximale Reduktion des PASI während der Alefacept-Therapie. Ein Patient ohne Besserung der Symptome verließ die Studie in Woche 5. Das durchschnittliche Alter erfolgreich therapierter Patienten lag bei 44 Jahren und somit 8 Jahre unter dem Durchschnittsalter der Patienten mit unzureichender PASI-Reduktion. Dies war jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied (p-Wert: 0.094).

Weiterhin konnte nur eine von 5 weiblichen Patienten in der Studie erfolgreich therapiert werden. Aber auch das Geschlecht der Studienteilnehmer ergab keine statistische Signifikanz bezogen auf den Studienausgang (p -Wert = 0.206).

Tabelle 9: Demographische Daten der Studienteilnehmer

Dargestellt sind alle erhobenen Daten inkl. der max. Reduktion der Psoriasis Symptome (PASI) unter Alefacept-Therapie, MW bezeichnet den Mittelwert der jeweiligen Patientengruppe. *Therapieerfolg definiert als: PASI-Reduktion ≥ 50 %; **Patient 20 verließ die Studie in Woche 5 der Therapie

Patient	Therapie-Erfolg*	Geschlecht	Alter [Jahre]	PASI vor Therapie	Max. PASI-Reduktion [%]
1	ja	männlich	52	11,2	90
2	ja	männlich	47	18,3	86
3	ja	männlich	34	14,4	85
4	ja	männlich	41	30,9	79
5	ja	männlich	39	11,6	75
6	ja	weiblich	50	20,1	67
7	ja	männlich	28	19,2	62
8	ja	männlich	37	14,3	57
9	ja	männlich	68	22,6	50
MW			44	18.1	72
10	nein	männlich	59	36,4	38
11	nein	weiblich	64	28,2	38
12	nein	weiblich	35	14,7	36
13	nein	männlich	37	23,3	35
14	nein	männlich	55	16,2	33
15	nein	weiblich	63	18,7	31
16	nein	weiblich	52	9,5	31
17	nein	männlich	70	25,6	23
18	nein	männlich	52	14,6	19
19	nein	männlich	37	7,3	18
20**	nein	männlich	51	21,2	1
MW			52	19,6	27

Die Symptomausprägung angegeben als PASI war in beiden Patientengruppen vor Therapiebeginn sehr ausgewogen (PASI von 18,1 bzw. 19,6). Die Symptome besserten sich in erfolgreich therapierten Patienten um durchschnittlich 72 % im Gegensatz zu 27 % in den nicht ausreichend erfolgreich therapierten Patienten.

In Abbildung 28 ist der Verlauf der PASI-Reduktion von beiden Patientengruppen noch einmal graphisch dargestellt. Auch hier wurde der PASI jedes Patienten auf seinen Ausgangswert vor Therapiebeginn (Woche 0) bezogen und in Prozent des Ausgangswertes angegeben. Es wird deutlich, dass beide Patientengruppen in den ersten 8 Wochen der Alefacept-Therapie kaum voneinander unterscheidbare PASI Verläufe aufwiesen.

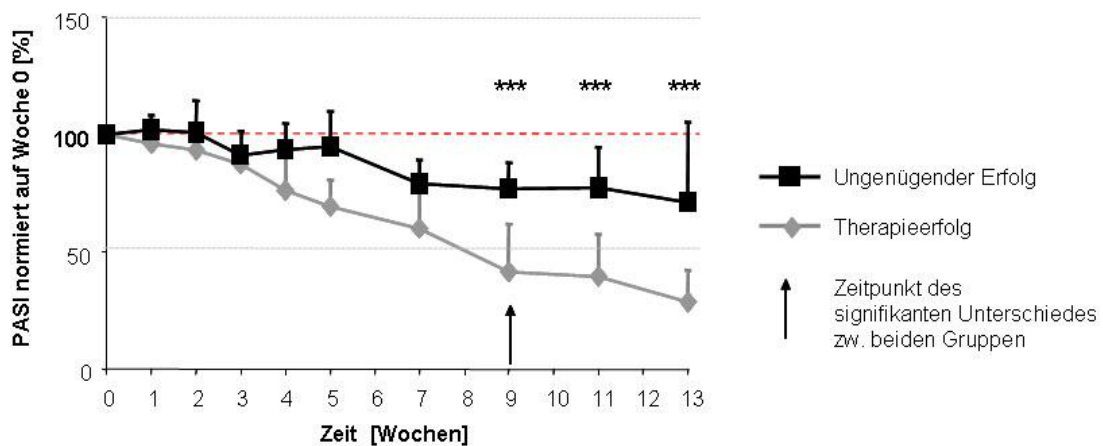


Abbildung 28: Prozentuale PASI-Reduktion bezogen auf den PASI Ausgangswert im Verlauf

Dargestellt ist der Verlauf des PASI von Patienten ohne ausreichenden Therapieerfolg [n = 11; schwarze Linie] und mit Erfolg der Therapie [n = 9; graue Linie]. Hierbei wurde eine PASI-Reduktion von 50 % als Therapieerfolg definiert. In Woche 9 [schwarzer Pfeil] unterscheiden sich beide Patientengruppen erstmals signifikant voneinander. Statistik :*** = p-Wert < 0.001 (Mann-Whitney-U-Test)

Erst in Woche 9 waren erfolgreich therapierte Patienten statistisch signifikant von solchen zu unterscheiden, die nicht ausreichend auf die Alefacept-Therapie reagierten.

4.3.2 Auswirkungen der Alefacept-Therapie auf Subpopulationen von T-Zellen

Das Blut der Patienten wurde vor Beginn der Alefacept-Therapie (Woche 0) und am Ende des Therapiezeitraums (Woche 12) bezüglich des Anteils der jeweiligen T-Zellsubpopulationen analysiert. Hierzu wurden $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen zusätzlich hinsichtlich ihrer CD2 und CD45RO Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie untersucht. Alefacept soll hauptsächlich auf T-Zellen wirken, die CD2 in hoher Dichte auf ihrer Zelloberfläche tragen ($CD2^{++}$) und als memory T-Zellen bezeichnet werden. CD45RO ist ein weiteres Oberflächenmolekül, das solche Gedächtniszellen charakterisiert. Es wurde bereits in anderen Studien gezeigt, dass Alefacept die Anzahl der $CD8^+$ und somit zytotoxische T-Zellen im Blut stark reduziert (43).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt und zeigen die prozentuale Anzahl der jeweiliger T-Zellsubpopulation am Ende der Therapie im Vergleich zu Woche 0 (vor Therapie =100 %). Es wird darin deutlich, dass $CD4^+$ T-Zellen in beiden Patientengruppen in gleichem Maße reduziert waren. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Dichte von CD2 und CD45RO auf $CD4^+$ T-Zellen zwischen beiden Gruppen detektiert werden. $CD8^+$ T-Zellen wurden stärker reduziert als $CD4^+$ T-Zellen.

Darüber hinaus waren Unterschiede zwischen erfolgreich und nicht erfolgreich therapierten Patienten sichtbar. So wurden sowohl CD45RO positive als auch CD2⁺⁺ T-Zellen in erfolgreich therapierten Patienten stärker reduziert als in nicht erfolgreich therapierten.

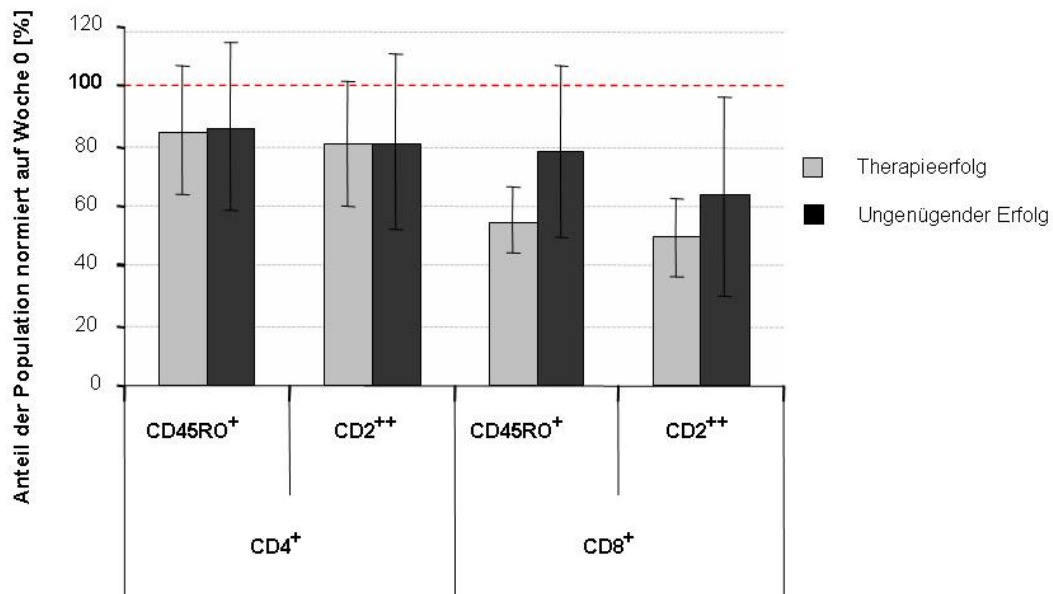


Abbildung 29: Anteil an T-Zellsubpopulationen im peripheren Blut der Studienpatienten

Dargestellt sind die Anteile der T-Zellsubpopulationen der Patienten mit Therapieerfolg [n = 9; graue Balken] und ohne ausreichenden Therapieerfolg [n = 11; schwarze Balken] nach 12-wöchiger Alefacept-Therapie bezogen auf den jeweiligen Anteil vor Therapie [rote Line = 100 %].

Diese Unterschiede waren nur im Vergleich zum Anteil der jeweiligen T-Zellsubpopulation vor Therapiebeginn signifikant. Zwischen erfolgreich therapierten Patienten und solchen ohne ausreichende PASI-Reduktion konnte jedoch keine signifikante Reduktion ermittelt werden.

4.3.3 Transkriptionelle Regulation von TOAG-1 und RHAMM unter Alefacept-Therapie

Ein wesentliches Ziel dieser Studie mit Alefacept in Psoriasis Patienten war es, TOAG-1 auf sein prädiktives Potential bezüglich des Therapieerfolges von Immunomodulation zu testen.

Die transkriptionelle Regulation von TOAG-1 und RHAMM *in vivo* sollte zeigen, ob eine frühzeitige Unterscheidung zwischen erfolgreich therapierten Patienten und solchen, deren Psoriasis nicht ausreichend effektiv mit Alefacept behandelbar war, möglich ist. Zu diesem Zweck wurde allen Patienten vor und während der Therapie mit Alefacept Blut entnommen und die Ausprägung ihrer Psoriasis Symptome anhand des PASI evaluiert. Aus dem Blut der Patienten wurde RNS isoliert und in cDNS umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Messung der jeweiligen Markergene mittels qRT-PCR (TaqMan® Technologie), wie bereits beschrieben (3.2.6). Die mRNA-Expression vor Therapie (Woche 0) wurde für jeden Patienten als 100 %

definiert und jeder Folgewert darauf bezogen. Diese Werte wurden nach Gruppen getrennt über die Therapiezeit aufgetragen und im Folgenden für jedes Markergen dargestellt. Tatsächlich stieg die TOAG-1 mRNA-Expression im Blut der Patienten, die mit einer Reduktion des PASI um mindestens 50 % auf die Alefacept-Therapie reagierten, in der frühen Therapiephase signifikant an, wie in Abbildung 30 A dargestellt.

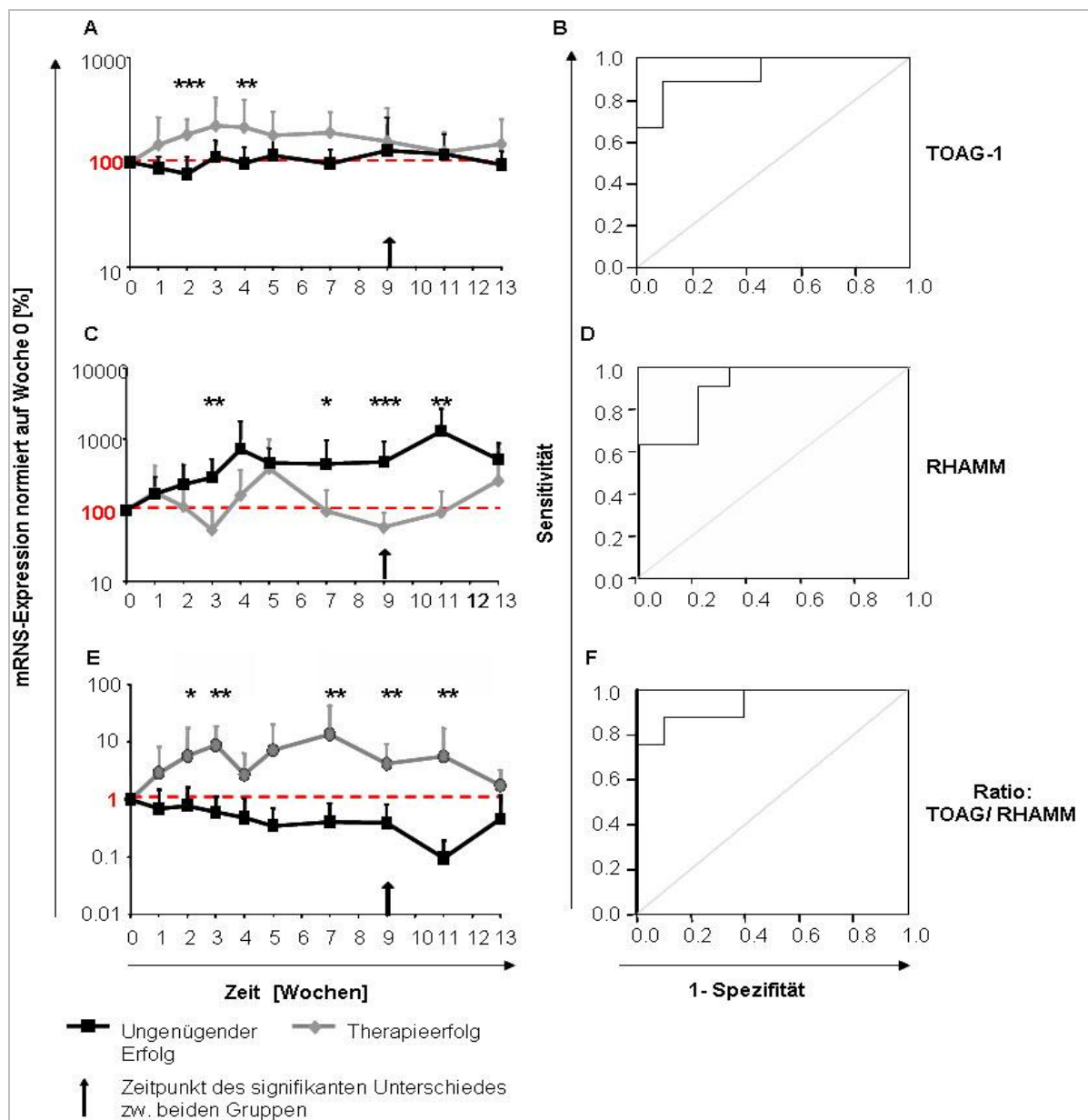


Abbildung 30: mRNA-Expression während der 12wöchigen Alefacept-Therapie *in vivo*

Dargestellt ist die mRNA-Expression von Patienten-PBMCs A TOAG-1, C RHAMM sowie E die Ratio aus beiden Genen gegen die Zeit normiert auf HPRT (ΔCT). Hierfür wurde jeder Verlaufswert auf die initiale mRNA-Expression vor Therapiebeginn [rote Line = Woche 0 = 100 % bzw. 1] bezogen. Die mRNA-Expression erfolgreich therapierter Patienten [n=9] ist durch eine graue Linie dargestellt und die nicht erfolgreich therapierter Patienten [n=11] ist durch eine schwarze Linie gekennzeichnet. Der schwarze Pfeil markiert Woche 9, in der beide Gruppen sich erstmals signifikant in ihrer PASI-Reduktion unterschieden. Weiterhin sind die jeweiligen ROC-Kurven der mRNA-Expression von B: TOAG-1 in Woche 2 bzw. D: RHAMM oder F: der Ratio aus beiden Genen in Woche 3 gezeigt.

Wohingegen Patienten, die keine PASI-Reduktion von mindestens 50 % erreichten, eine durchweg gleich bleibende TOAG-1-Expression auf mRNA-Ebene zeigten. Zum Ende der Therapie hin glichen sich die Expressionniveaus von beiden Gruppen wieder an. In Woche 2 unterscheiden sich beide Patientengruppen um das 2,4-fache bezüglich der Veränderung der TOAG-1-mRNA-Expression über die Zeit. Die ROC-Kurve dieses Zeitpunktes zeigt das Potential von TOAG-1 als Biomarker. Sie ist in Abbildung 30 B dargestellt. Je größer die Fläche unter der Kurve (area under the curve = AUC) ist, desto besser geeignet ist der Marker, um zwischen zwei Gruppen zu unterscheiden. TOAG-1 erreichte in Woche 2 eine AUC von 0,929, die einen geeigneten Biomarker charakterisiert. Der Grenzwert des Biomarkers, auch als cut-off Wert bezeichnet, der beide Gruppen unterscheidet, wurde auf 115 % der initialen TOAG-1-Expression festgelegt. Bei diesem Wert erreichte TOAG-1 seine optimale Sensitivität von 0,889 und Spezifität von 0,909. Nach diesem Schema wurde ebenfalls die mRNA-Expression von RHAMM ausgewertet. Sie ist in Abbildung 30 C dargestellt. RHAMM war, im Gegensatz zu TOAG-1, in den Patienten herauf reguliert, deren PASI-Reduktion unter 50 % des initialen Wertes blieb. Wie die TOAG-1-Transkription war auch die von RHAMM schon in den ersten Wochen der Therapie zwischen den beiden Patientengruppen signifikant unterschiedlich reguliert. Darüber hinaus war RHAMM in beiden Patientengruppen über fast den gesamten Therapieverlauf verschieden reguliert. Die RHAMM Expression in Woche 3 war am besten geeignet, um frühzeitig zwischen beiden Gruppen zu unterscheiden. Beide Patientengruppen waren hier durch einen 5,5-fachen Unterschied in der Veränderung der RHAMM Transkription voneinander abgrenzbar. Die AUC zu diesem Zeitpunkt war mit 0,925 ähnlich groß, wie die von TOAG-1 in Woche 2. Der cut-off Wert der RHAMM mRNA wurde bei 145 % der initialen Expression festgelegt, da sie dort eine Sensitivität von 0,7 und eine Spezifität von 1 erreichte. Demzufolge war sowohl die TOAG-1-Expression, als auch die mRNA Regulation von RHAMM in der Lage, weitaus früher als die Änderung des PASI allein (Woche 9), zwischen beiden Patientengruppen zu unterscheiden. RHAMM zeichnete sich durch eine sehr hohe Spezifität aus, während TOAG-1 eine sehr hohe Sensitivität erreichte. Weiterhin konnte RHAMM, im Gegensatz zu TOAG-1, auch gegen Ende der Therapie zwischen beiden Patientengruppen unterscheiden. Um die Erkennung erfolgreich therapierter Patienten zu optimieren, wurden beide Marker in einer Ratio miteinander kombiniert. Sie ist in Abbildung 30 E dargestellt. Man erkennt deutlich, dass die Unterschiede zwischen beiden Gruppen durch die Kombination beider Marker vergrößert wurden und somit eine bessere Unterscheidung zu fast allen Zeitpunkten in der Therapie möglich war. Die Ratio der Patienten, die nicht adäquat auf die Alefacept-Behandlung

reagierten, veränderte sich im Gegensatz zu den Patienten, die mit über 50 % Reduktion der Symptome reagierten, kaum. Erfolgreich therapierte Patienten zeigten eine signifikant höhere Ratio aus TOAG-1 und RHAMM-mRNS-Expression. Die Analyse der ROC-Kurve aus Woche 3 dieser Ratio ist in Abbildung 30 F dargestellt. Sie zeigte bei dem optimalen cut-off-Wert von 1,36 eine Sensitivität von 0,889 und eine Spezifität von 0,909. Die Fläche unter der Kurve betrug 0,939 und war somit noch größer als von TOAG-1 oder RHAMM allein. Dementsprechend konnte die Berechnung einer Ratio aus beiden Markern die Unterscheidung zwischen beiden Patientengruppen gegenüber der jeweiligen Einzelauswertung tatsächlich verbessern

4.3.4 Regulation anderer relevanter Gene unter Alefacept-Therapie

Andere Markergene könnten durch immunmodulatorische Therapien, wie Alefacept, ebenfalls in ihrer Transkription verändert werden. Da die mRNS-Expression von TOAG-1 und RHAMM bereits in Woche 2 und 3 nach Beginn der Alefacept-Therapie zwischen beiden Patientengruppen unterschiedlich reguliert war, wurde die mRNS anderer potentiell relevanter Markergene zu den gleichen Zeitpunkten untersucht. Dabei handelt es sich unter anderem um Foxp3, das von natürlichen regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und für deren Funktion essentiell ist. Es wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass Foxp3 in der Dermis von Patienten mit Psoriasis oder Atopischer Dermatitis gegenüber gesunder Haut vermindert ist (82). Daher könnte auch die Foxp3 mRNS zwischen Patienten mit und ohne ausreichenden Therapieerfolg unterschiedlich reguliert sein. In Abbildung 31 A ist die Foxp3-mRNS-Expression beider Patientengruppen zu Beginn der Therapie (Woche 0) sowie 2 und 3 Wochen danach dargestellt. Beide Patientengruppen wiesen vor der Alefacept-Behandlung eine vergleichbar starke Foxp3-Transkription auf. In den Wochen 2 und 3 zeigten Patienten, die mit einer PASI-Reduktion von weniger als 50 % auf die Therapie reagierten, eine leicht verringerte Foxp3-mRNS-Expression. Diese Unterschiede waren jedoch weder zwischen beiden Patientengruppen, noch in Bezug auf die initiale Foxp3-Expression in Woche 0 signifikant. Ein weiteres potentiell unterschiedlich reguliertes Gen ist der T-Zell-Aktivierungsmarker CD69, der bereits nach *in vitro*-Behandlung mit Alefacept in verschiedenen T-Zellsubtypen untersucht wurde (4.2.2). Dort war eine leicht unterschiedliche transkriptionelle Regulation zwischen Alefacept behandelten und unbehandelten T-Zellen festzustellen. Darüber hinaus wurde CD69 bereits in anderen Arbeiten als potentieller Marker für die frühzeitige Erkennung des Therapieerfolgs von Alefacept in Psoriasis-Patienten beschrieben (43). In Abbildung 31 B ist die mRNS-Expression von CD69 der beiden Patientengruppen dargestellt. Die CD69-mRNS Expression war vor Therapiebeginn in

solchen Patienten, die eine ungenügende PASI-Reduktion zeigten, leicht erhöht. In Woche 2 und 3 näherten sich beide Patientengruppen in ihrer CD69-Expression einander an. Daher waren weder vor, noch während der ersten Wochen der Alefacept-Therapie signifikanten Unterschiede bezüglich der CD69-mRNS-Expression erkennbar.

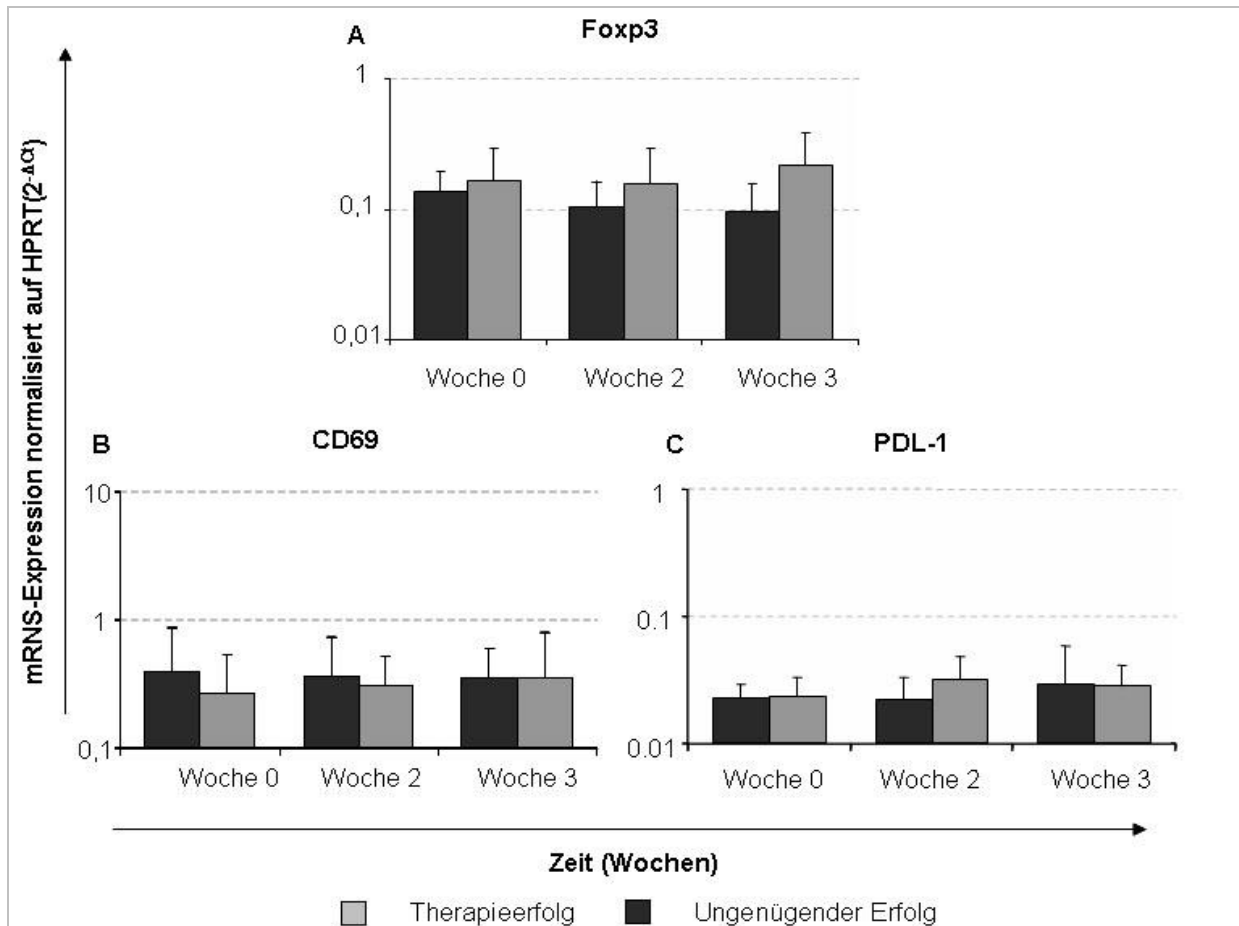


Abbildung 31: mRNS-Expression von Foxp3, CD69 und PD-L1 vor Therapie sowie in den Wochen 2 und 3 nach Behandlungsbeginn

Dargestellt ist die Transkription von **A: Foxp3**, **B: CD69** und **C: PD-L1** normiert auf HPRT von erfolgreich therapierten Patienten [n = 9; graue Balken] und nicht erfolgreich therapierten Patienten [n = 11; schwarze Balken].

Darüber hinaus wurde die PD-L1-mRNS-Expression in beiden Patientengruppen sowohl in Woche 2 und 3 als auch vor Therapiebeginn untersucht. Wie in dieser Arbeit bereits erläutert, konnte die PD-L1-Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen und CD4⁺ T-Zellen durch die Alefacept-Behandlung gesteigert werden (4.2.6.). Daher wurde nun analysiert, ob die PD-L1-mRNS-Expression den Therapieerfolg von Alefacept anzeigen kann. Wie in Abbildung 31 C dargestellt, zeigten beide Patientengruppen eine ähnliche PD-L1-Expression vor Therapiebeginn. Lediglich in Woche 2 war die PD-L1-Transkription in erfolgreich therapierten Patienten leicht erhöht. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen festgestellt werden.

5 Diskussion

Es konnte bereits in anderen Studien mit immunmodulatorischen Medikamenten gezeigt werden, dass die Transkription des Toleranz-assoziierten Gens 1 (TOAG-1) mit deren Wirkung korrelierte. Die Behandlung mit anti-CD4-Antikörpern nach allogener Transplantation von Nieren im Ratten-Modell und auch von Herzen im Maus-Modell induzierte Toleranz gegenüber dem Transplantat. In den so behandelten Tieren blieb die Transkription von TOAG-1 sowohl im Organ, als auch im Blut, stabil. Tiere, die diese Behandlung nicht erhielten, stießen ihr Organ ab und zeigten noch vor den ersten klinischen Anzeichen der Abstoßung einen dramatischen Abfall der TOAG-1-mRNS-Expression (44). Da TOAG-1 bisher bezüglich Funktion und Lokalisation des Proteins völlig unbekannt war, stand seine funktionelle Charakterisierung im Fokus dieser Arbeit. Ziel war es mit Hilfe von *in vitro* Analysen, die mögliche Ursache für die beobachtete unterschiedliche Regulation von TOAG-1 nach Toleranzinduktion *in vivo* zu ermitteln. Dabei stand vor allem die Rolle von TOAG-1 in T-Zellen im Vordergrund. Hier sollte analysiert werden, wie T-Zellen auf eine gesteigerte mRNS-Expression von TOAG-1 reagieren.

Zudem war es von großem Interesse, wie die *in vitro*-Behandlung mit immunmodulatorischen Agenzien auf die Aktivierung und die Apoptose von T-Zellen aber auch auf die TOAG-1-Transkription wirkt. Zu diesem Zweck wurde ein Vertreter dieser Medikamentenklasse, das Biologikum Alefacept, für weitere Analysen ausgewählt. Alefacept ist durch die FDA zugelassen und wird bei der Behandlung der Psoriasis eingesetzt. Wie viele andere Biologika auch, wirkt es jedoch nicht in jedem Patienten gleich effektiv. Daher ist es wichtig, Biomarker zu identifizieren und zu charakterisieren, die ein Therapieansprechen sehr früh anzeigen. Um die Übertragbarkeit unserer *in vitro* Analysen auf die *in vivo* Umstände zu prüfen, wurde eine Studie mit Psoriasis-Patienten, die das Biologikum Alefacept erhielten, durchgeführt. Sie sollte insbesondere zeigen, ob TOAG-1 in Menschen mit erfolgreicher immunmodulatorischer Therapie und in Patienten mit ungenügendem Therapieerfolg, unterschiedlich reguliert ist. Hierzu wurde die Transkription von TOAG-1 vor und während der 12-wöchigen Behandlung mit Alefacept in den PBMCs der Patienten untersucht. Zusätzlich wurden auch eine Reihe weiterer potentieller Markergene in gleicher Weise analysiert. Hier erwies sich der Rezeptor für Hyaluronan-vermittelte Migration (RHAMM) als besonders vielversprechend (48, 49).

5.1 Funktionelle Charakterisierung von TOAG-1

Für die funktionelle Charakterisierung war es zunächst wichtig zu ermitteln, wo das kernkodierte Protein TOAG-1 lokalisiert ist. Die Aminosäuresequenz zeigte zwar keine Ähnlichkeiten mit anderen Peptiden oder Proteinen, jedoch enthielt sie ein mitochondriales Sortierungssignal. Für die subzelluläre Lokalisation von TOAG-1, wurde die Sequenz des murinen TOAG-1 N-terminal unter Verlust des Stoppcodons der TOAG-1 Sequenz in den pEGFP-N1-Vektor kloniert. Das so erhaltene Plasmid, kodierend für ein Fusionsprotein aus TOAG-1 und EGFP, wurde mittels liposomaler Transfektion in eukaryotische Zellen verbracht, dort prozessiert und exprimiert. Durch das EGFP als Teil des Fusionsproteins konnte die Lokalisation des Proteins mit dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich Zellkompartimente wie Zellkern, Mitochondrien und Lysosomen mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um eine mögliche Ko-Lokalisation sichtbar zu machen. Wie in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt, ist das TOAG-1-EGFP-Fusionsprotein ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert und nicht in den Lysosomen, dem Zytoplasma oder dem Zellkern.

Die Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle in mehreren Prozessen innerhalb der Zelle. So sind sie sowohl an der Energieerzeugung, die auch für die Aktivierung von T-Zellen unerlässlich ist, aber auch an der Einleitung von Apoptose maßgeblich beteiligt. Vor allem dem mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) kommt eine ausschlaggebende Bedeutung bezüglich der ATP-Synthese aber auch der Kontrolle Apoptose-induzierender reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie H_2O_2 , zu. Dieses Membranpotential ist die Folge eines elektrochemischen Gradienten, der durch zwei Transportsysteme aufrechterhalten wird. Zum einen erfolgt ein Elektronenaustausch des NADH an die Elektronen-Transportkette. Diese bewirkt einen Protonenfluss durch die Atmungskomplexe der inneren Mitochondrienmembran. Zum anderen werden diese Protonen durch den ATP-Synthase-Komplex (F_0 und F_1) wieder durch die innere Mitochondrienmembran zurücktransportiert und ADP kann unter oxidativer Phosphorylierung zu ATP synthetisiert werden (83, 84). Dies führt zum Aufbau eines pH-Gradienten zwischen innerer Membran und Matrix und zu einem Membranpotential mit einer negativen Innenseite und einem positiven Äußeren. Je stabiler dieses mitochondriale Membranpotential ist, desto besser sind die Atmungskomplexe der inneren Mitochondrienmembran in der Lage, Protonen für die ATP-Synthese bereitzustellen. Wird das $\Delta\Psi_m$ durch extrazelluläre oder intrazelluläre Signale gestört, so kommt es zur Ausschüttung von

Cytochrom c und somit zur Aktivierung der Effektor-Caspasen. Sie aktivieren Enzyme, welche die DNS im Zellkern fragmentieren und so den Tod der Zelle einleiten. Wichtige Auslöser dieses Prozesses sind, wie bereits erwähnt, die ROS, welche in hoher Konzentration zu oxidativem Stress der Zelle führen. Zusammen mit Kalzium sorgen sie für die Öffnung der so genannten Permeabilitäts-Transitions-Pore (PTP). Daraufhin können Protonen und Kalzium unkontrolliert die innere mitochondriale Membran passieren, wodurch das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht. Die Zelle ist somit nicht mehr in der Lage, Energie in Form von ATP bereitzustellen (85).

Da TOAG-1 in den Mitochondrien lokalisiert ist, lag der Schluss nahe, dass es an diesen so entscheidenden Prozessen beteiligt ist. Deshalb wurde zunächst die TOAG-1-Transkription während der Energie-verbrauchenden T-Zellaktivierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden $CD4^+$ T-Zellen aus Splenozyten von C57BL/6 Mäusen isoliert und mit allogenen B-Zellen aus Balb/c Mäusen *in vitro* stimuliert. Wie in Abbildung 9 dargestellt, sank die TOAG-1-mRNS-Expression nach T-Zellaktivierung *in vitro* stark ab. Dieser Verlust konnte jedoch durch die Behandlung mit dem anti-CD4-Antikörper (YTS177.9) abgeschwächt und mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A sogar verhindert werden. TOAG-1 wurde folglich während des energetisch aufwendigen Prozesses der T-Zellaktivierung nur vermindert transkribiert. Wurde die T-Zellaktivierung jedoch modifiziert oder inhibiert, so blieb die TOAG-1-Transkription stabil. Zusätzlich wurde das mitochondriale Membranpotential während der T-Zellaktivierung und deren Modulation mit dem anti-CD4-Antikörper untersucht. Hierzu wurden erneut $CD4^+$ T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen allogenen stimuliert und nach 4 Tagen mit dem Membran-gängigen Farbstoff Tetramethylrhodamin-Methyl-Ester (TMRM) gefärbt (86). $CD4^+$ T-Zellen, die mit dem nicht depletierenden anti-CD4-Antikörper behandelt wurden, zeigten eine deutlich verminderte Aufnahme des Potential-abhängigen Farbstoffes verglichen mit unbehandelten, allogenen stimulierten $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 10). Die Modulation der T-Zellaktivierung führte demnach zum Erhalt der TOAG-1-Transkription und zur Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$. Ob ein Zusammenhang zwischen dem $\Delta\Psi_m$ und TOAG-1 besteht, sollte durch die Überexpression von TOAG-1 mit retroviralem Gentransfer analysiert werden. Als Kontrolle dienten jeweils Viruspartikel, die nach Ko-Transfektion des leeren retroviralen Expressionsvektors gewonnen wurden. Die Analysen konnten durchflusszytometrisch erfolgen, da der retrovirale Expressionsvektor ebenfalls für das GFP kodiert. Abbildung 14 zeigt, dass TOAG-1 überexprimierende $CD4^+$ T-Zellen 5 Tage nach Infektion über ein geringeres $\Delta\Psi_m$ verfügen als, Kontroll-GFP-Virus-infizierte $CD4^+$ T-Zellen. Die Schwankungen zwischen den 3 unabhängigen Messungen waren recht groß. Daher ergeben

sich in der Zusammenfassung ausgeprägte Standardabweichungen und es konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden. Dennoch ergab jede Messung für sich betrachtet eine deutliche Destabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials von TOAG-1 überexprimierenden CD4⁺ T-Zellen gegenüber den Kontroll-infizierten T-Zellen. Dieser Effekt scheint also nicht auf dem Stress der Infektion, sondern auf die vermehrte TOAG-1-Expression zu beruhen. Wie bereits erwähnt, ist ein destabilisiertes mitochondriales Membranpotential ein erstes Anzeichen für die einsetzende Apoptose. Daher wurde zusätzlich die Apoptoseneigung nach dem gleichen experimentellen Aufbau durch die Färbung mit Annexin-V, welches spezifisch Phosphatidylserin anfärbt, ermittelt (87). Die Apoptoseneigung von TOAG-1 überexprimierenden CD4⁺ T-Zellen war im Mittel ca. 50 % höher als von Kontroll-infizierten Zellen, wie in Abbildung 15 deutlich wird. Jedoch führte eine starke Inter-Assay-Varianz der 3 unabhängigen Experimente mit anschließender Annexin-V Messung, erneut zu großen Standardabweichungen, die keine statistische Signifikanz ermöglichten. Dennoch scheint eine gesteigerte TOAG-1-Expression, die Apoptose-Induktion zu begünstigen.

Das mitochondriale Protein TOAG-1 könnte möglicherweise die ROS Produktion beeinflussen. Eine erhöhte ROS Produktion führt zu mitochondrialem Stress und zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Darüber hinaus aktivieren ROS den Transkriptionsfaktor NFAT (= nuclear factor of activated T cells), der die Freisetzung des Zytokins TNF α aber auch des IL-2 reguliert (88, 89). Auch die Ca²⁺ Ausschüttung könnte durch TOAG-1 beeinflusst sein. Das Mitochondrium enthält Kalziumkanäle (CRAC), die mit Hilfe eines intakten mitochondrialen Membranpotentials schnell Ca²⁺ aufnehmen aber auch wieder abgeben können. Ca²⁺ kann so verschiedenste Signalwege aktivieren. Nach Stimulation des T-Zellrezeptors wird Ca²⁺ ausgeschüttet und wirkt auf drei wichtige Transkriptionsfaktorfamilien, auf das bereits erwähnte NFAT, NF- κ B (= nuclear factor kappaB) und AP-1 (activator protein-1). Es führt so zu veränderter Transkription, zur T-Zellaktivierung oder auch zur Apoptose (90-93). Würde eine Überexpression von TOAG-1 das Zytokinmuster von aktivierten T-Zellen verändern, so könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass es innerhalb dieser Signalwege eine Rolle spielt. Hierzu wurde der Zytokingehalt der Zellkulturüberstände 5 Tage nach Infektion primärer muriner CD4⁺ T-Zellen mit TOAG-1-bzw. Kontroll-Virus durch den Th1/Th2 Cytometric Bead Array (CBA) analysiert. Dieser Test beruht auf der spezifischen Bindung unterschiedlich großer Partikel an ausgewählte Zytokine, deren Konzentration anhand einer Standardkurve durchflusszytometrisch bestimmt wird. Unser ausgewählter Array detektiert Zytokine, die den verschiedenen Typen der Immunantwort nach T-Zellaktivierung zugeordnet sind (siehe Abbildung 2). Die Infektion mit dem Kontroll-Virus bewirkte eine Verdoppelung der Konzentration von IFN γ und IL-4 im

Zellkulturüberstand gegenüber uninfizierten primären CD4⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 16). Auch IL-10 war leicht erhöht. Die Infektion mit TOAG-1 Virus führte zu keiner Induktion dieser Zytokine und schwächte somit die Effekte der Infektion auf die primären CD4⁺ T-Zellen ab. Weitere, im Test enthaltene, Zytokine (IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-17, TNF α und GM-CSF) waren nicht detektierbar, da ihre Konzentration unter der Nachweisgrenze blieb. Möglicherweise war der Zeitpunkt der Zytokinmessung ungünstig gewählt. Zusätzlich könnten Infektionsprotokolle mit einer höheren Zelldichte die Transduktionsrate erhöhen und den Zytokingehalt im Überstand verstärken.

In Abbildung 32 ist die Regulation von TOAG-1 und seine möglichen Wirkungen während der T-Zellaktivierung und der Apoptose zusammengefasst dargestellt.

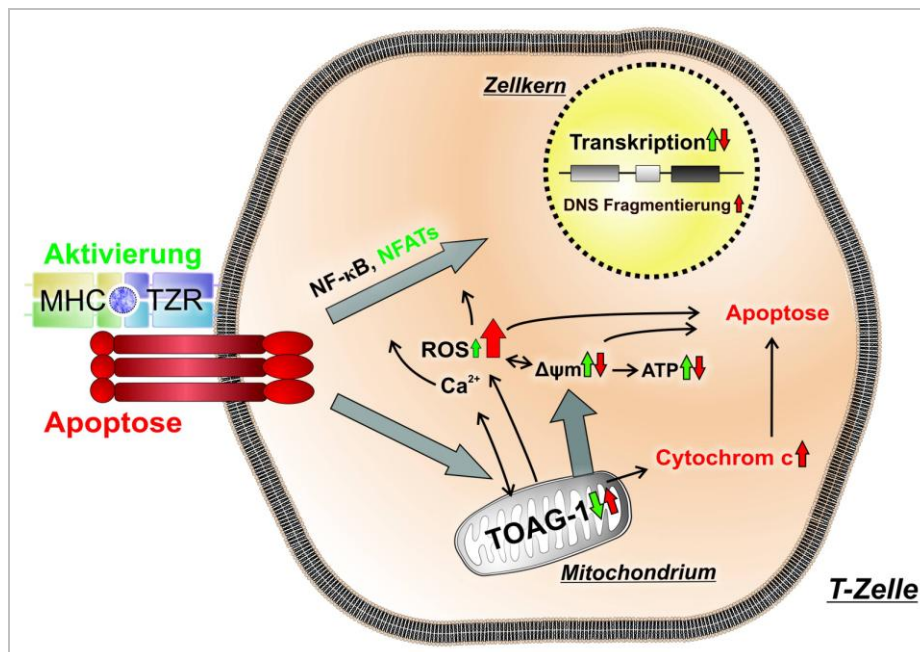


Abbildung 32: Schematisches Modell der vermutlichen TOAG-1 Wirkungen während der T-Zellaktivierung und der Apoptose

Dargestellt ist die TOAG-1 Regulation nach der T-Zellaktivierung (grün) bzw. die mögliche Rolle von TOAG-1 bei der Apoptose (rot). Das erste und zweite Signal zur T-Zellaktivierung löst eine Kaskade aus, bei der Ca²⁺ ins Zytosol abgegeben und NF- κ B aktiviert. Zytosolisches Ca²⁺ bewirkt die Aktivierung von Calcineurin, das NFAT dephosphoryliert und so seine Translokation in den Nucleus ermöglicht. Dort initiiert es die vermehrte Transkription von Zytokinen (u.a. IL-2) und somit die Zellproliferation. Dafür wird ATP benötigt, das durch die Elektronentransportkette innerhalb der mitochondrialen Membran bereitgestellt wird. Dieser Prozess wird durch die sensible Produktion von ROS und die Regulation des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) gesteuert. Die Transkription des mitochondrialen Proteins TOAG-1 war nach der T-Zellaktivierung transient reduziert. Eine TOAG-1 Überexpression führte zur Verringerung des mitochondrialen Potentials. Daher könnte es bei der Regulation von ROS, Ca²⁺, des $\Delta\psi_m$ aber auch bei der ATP Synthese (Elektronen-Transportkette) eine Rolle spielen. Dauerhafte Stimulation des TCR hingegen führt zur verstärkten Produktion von ROS. Dieser oxidative Stress wirkt auf NF- κ B, das nun eine gesteigerte Expression von Fas-L induziert. Die Formierung der Todesdomäne ermöglicht den extrinsischen AICD durch die Aktivierung von Caspase 8. Als verstärkenden Prozess kann Caspase 8 zusätzlich über die Spaltung von Bid den intrinsischen Apoptoseweg einleiten. (siehe auch Abbildung 3) Das $\Delta\psi_m$ bricht daraufhin zusammen, große Mengen Ca²⁺ und Cytochrom c werden ausgeschüttet. Die anschließende Formierung des Apoptosoms und die Caspase 9 führen über die Effektorcaspasen 3/7 ebenfalls zum Tod der Zelle (84). Die Überexpression von TOAG-1 in aktivierten T-Zellen führte auch zur verstärkten Apoptoseneigung. Daher ist eine Rolle von TOAG-1 bei dem AICD oder bei der Verknüpfung beider Apoptosewege sehr wahrscheinlich.

TOAG-1 ist daher ein kernkodiertes und mitochondrial lokalisiertes Protein, das den programmierten Zelltod von aktivierten T-Zellen verstärkt, wenn es erhöht exprimiert wird. Unsere *in vitro* Daten zeigen, dass die TOAG-1-Transkription nach der T-Zellaktivierung durch allogene Stimulation dramatisch abfällt. Dieser Abfall wurde ebenfalls *in vivo* nach allogener Transplantation in verschiedenen Nager-Modellen beobachtet (44). Der Abstoßung eines Transplantats geht die Rekrutierung von Immunzellen in das Organ voraus. Das allogene Gewebe mit fremden Peptiden, die durch eigene und auch fremde MHC Moleküle präsentiert werden, löst eine Reihe von Immunreaktionen aus, die ebenfalls die Aktivierung von T-Zellen beinhaltet. Während der Toleranzinduktion in diesen Transplantationsmodellen wurde eine stabile TOAG-1-mRNS-Expression im Transplantat und den peripheren Blutzellen gezeigt. Auch diese Beobachtungen werden durch unsere *in vitro* Ergebnisse erklärbar. Der Abfall der TOAG-1-mRNS-Expression von allogenen stimulierten T-Zellen konnte durch die *in vitro* Behandlung mit immunmodulatorischen Medikamenten, wie Cyclosporin A oder einem anti-CD4-Antikörper vermieden werden. Daher war die stabile TOAG-1-Transkription im Transplantat und in den peripheren Blutzellen möglicherweise das Resultat einer verminderten Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen in das Organ. Daraufhin bleibt eine schwere Entzündung aus, die sich ebenfalls in einer stabilen TOAG-1-mRNS-Expression der peripheren Blutzellen widerspiegelt.

Fraglich bleibt der exakte Prozess bei dem TOAG-1 in die Signaltransduktion während der Apoptose-Induktion aktivierter T-Zellen, eingreift. Sehr wahrscheinlich ist ein Einfluss von TOAG-1 auf die Rezeptor-induzierte Apoptose nach T-Zellaktivierung (AICD), da die TOAG-1-Transkription direkt nach T-Zellaktivierung erst stark abfällt, sich aber nach 4 Tagen wieder stabilisiert (siehe Abbildung 9). Dieser Verlauf spricht zunächst für eine starke Proliferation von T-Zellen, die aber nach angemessener Zeit wieder durch AICD gedrosselt wird. Dies wirkt somit einer Überreaktion der Immunantwort entgegen. Nach Formierung der Todesdomäne während des AICD wird die Caspase 8 aktiviert, wie in Abbildung 3 dargestellt ist. Sie spaltet durch Proteolyse das BH3-only Protein Bid zu tBid, das nun zur äußeren mitochondrialen Membran transloziert. Dort löst es die Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und/oder Bak aus, die zur Cytochrom c-Ausschüttung des Mitochondriums und somit zur Apoptose der Zelle führt (94). Der genaue Ablauf der Aktivierung von Bax und Bak über Bid ist noch nicht vollständig aufgeklärt. So könnte tBid direkt Bax/Bak aktivieren oder eine Blockade von Bax und Bak durch Bcl2, aufheben und darüber die Aktivierung indirekt ermöglichen (27). Hierbei könnte TOAG-1 eine pro-apoptotische Rolle einnehmen. Die Analyse welche Caspasen nach TOAG-1 Überexpression (retroviraler Gentransfer) oder Transkriptionshemmung (TOAG-1 siRNS) aktiv

sind, würde Aufschluss über den TOAG-1-beeinflussbaren Apoptoseweg geben. Die Effektor-Caspasen 3/7 sind mit den beiden Apoptosewegen, dem intrinsischen und dem extrinsischen assoziiert (95), während die Initiator-Caspase 8 nach Induktion der extrinsischen Apoptose (AICD) aktiviert wird (96). Zusätzlich wäre auch die Initiator-Caspase 9 interessant, da sie nach Induktion der intrinsischen Apoptose aktiv ist (97).

Darüber hinaus könnte die Messung des ROS–Levels nach Überexpression oder Transkriptionshemmung von TOAG-1 ebenfalls weiteren Einblick in seine Funktion ergeben.

5.2 Immunmodulation mit Alefacept *in vitro*

Alefacept ist ein ausschließlich-humanes Fusionsprotein, das aus dem Lymphozyten Funktions-assoziierten Antigen-3 (= LFA-3, CD58) und dem Fc-Fragment des humanen Immunglobulins 1 (= IgG1) besteht. Sein bisher beschriebenes Wirkprinzip beruht auf der Bindung des LFA-3-Anteils an CD2 vornehmlich auf memory T-Zellen, die CD2 in hoher Dichte exprimieren. Somit wird ein ko-stimulatorisches Signal während der T-Zellaktivierung blockiert (98). Wie in Abbildung 17 dargestellt, führte die *in vitro* Behandlung mit Alefacept zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation nach allogener Stimulation in einer gemischten Lymphozyten-Kultur (MLC). Zusätzlich ist beschrieben, dass das Fc-Fragment von Alefacept durch den Fc γ -Rezeptor III (= Fc γ RIII, CD16) auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) oder Makrophagen gebunden wird. Diese Bindung veranlasst die NK-Zellen oder Makrophagen zur Ausschüttung von Granzym B, welches in der durch Alefacept gebundenen T-Zelle Apoptose auslöst [siehe Abbildung 4, (38, 39)]. Alefacept wird vor allem zur Behandlung von schwerer Psoriasis und anderen Dermatosen eingesetzt (99, 100). Seine Wirkung wird derzeit aber auch in anderen medizinischen Fragestellungen, wie der Behandlung der Transplantat-Wirt-Reaktion (= graft-versus-host-disease, GvHD) nach einer Knochenmarktransplantation getestet (34, 101).

Die Immunmodulation von murinen CD4⁺ T-Zellen mit Cyclosporin A oder einem anti-CD4-Antikörper konnte die Reduktion des TOAG-1-mRNS-Expressionsniveaus nach T-Zellaktivierung abschwächen oder ganz verhindern. Auch Alefacept beeinflusst die Immunreaktion. Daher wurde die transkriptionelle Regulation von TOAG-1 und einem weiteren potentiellen Markergen, dem Rezeptor für Hyaluronan-vermittelte Migration (RHAMM) unter *in vitro* Behandlung mit Alefacept untersucht. Die Interaktion zwischen RHAMM und Hyaluronan spielt eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von Protein-Tyrosinekinasen (PTK), welche die Differenzierung und das Wachstum von Zellen, enzymatisch steuern (46, 47).

Weiterhin konnten Studien zeigen, dass RHAMM an der Rekrutierung von Makrophagen während der Entzündungsreaktion beteiligt ist und somit auch entscheidend zur Ausprägung der

Entzündung beiträgt (48, 49). Darüber hinaus war die transkriptionelle Regulation von RHAMM, ähnlich wie die von TOAG-1, im Nierentransplantations-Modell der Ratte zwischen Toleranz-entwickelnden Tieren und solchen, die ihr Transplantat abstießen, stark unterschiedlich [Sawitzki et al, noch nicht publiziert]. Die Transkription von RHAMM wurde nach allogener Stimulation humaner PBMCs verzehnfacht, während die TOAG-1-mRNS-Expression in der gleichen Größenordnung abfiel (siehe Abbildung 18). Alefacept konnte die TOAG-1-mRNS-Expression von allogenen stimulierten PBMCs, gegenüber der unbehandelten aber ebenfalls allogenen stimulierten Kontrolle, signifikant steigern. Die RHAMM Transkription hingegen, wurde durch die *in vitro* Behandlung mit Alefacept signifikant verringert. Auch wenn Alefacept erst 3 Tage nach allogener Stimulation zugegeben wurde, war der gleiche Trend bezüglich der RHAMM Transkription erkennbar, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (siehe Abbildung 19). Daher veränderte Alefacept die Transkription von RHAMM unabhängig vom Aktivierungszustand der peripheren Blutzellen. Somit hat Alefacept scheinbar nicht nur Einfluss auf die T-Zellaktivierung zum Zeitpunkt des allogenen Stimulus, sondern auch auf den Erhalt bereits aktivierter T-Zellen. Dennoch scheint die Hemmung der Initiierung der T-Zellaktivierung den größeren Einfluss gegenüber der Wirkung auf bereits aktivierte T-Zellen zu haben. Die Änderung der RHAMM Transkription in T-Zellen, die erst nach allogener Stimulation mit Alefacept behandelt wurden, geht sehr wahrscheinlich auf die Fc γ RIII vermittelte Apoptose zurück. Ebenfalls denkbar ist jedoch, dass die Applikation von Alefacept 3 Tage nach der allogenen Stimulation lediglich eine Aktivierung weiterer T-Zellen verhindert.

Es ist bereits beschrieben, dass Alefacept vornehmlich auf memory T-Zellen wirkt, da sie durch eine besonders hohe Dichte von CD2 Molekülen charakterisiert sind (38). Deshalb wurde ebenfalls die Transkription von allogenen stimulierten T-Zellsubtypen analysiert. Zu diesem Zweck wurden sowohl naive als auch memory CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels indirekter magnetischer Zellsortierung (MACS) isoliert und getrennt mit allogenen CD3-depletierten PBMCs stimuliert. Die Transkription von TOAG-1, RHAMM und CD69, einem Marker für den Aktivierungszustand von T-Zellen, wurde vor der allogenen Stimulation und am Tag 4 der Ko-Kultur, mit qRT-PCR ermittelt (81). Die Analyse der Genexpression gesunder, allogenen stimulierter T-Zellsubtypen mit und ohne Alefacept ist bisher nicht beschrieben worden. Alle drei untersuchten T-Zellsubtypen exprimierten die analysierten Markergene vor Beginn der Stimulation vergleichbar stark (Abbildung 20 A). Auffällig war die starke CD69-Expression vor der allogenen Stimulation. Dies ist eventuell auf die Separationsprozedur der T-Zellsubtypen zurückzuführen. Die TOAG-1-mRNS-Expression war in allen drei untersuchten und mit Alefacept behandelten T-Zellsubtypen stärker als in den jeweils unbehandelten aber allogenen

stimulierten Kontrollen (Abbildung 20 B). Dieser Trend war unabhängig von dem Applikationszeitpunkt des Alefacept und war sowohl in naiven als auch in memory CD4⁺ T-Zellen, die Alefacept zusammen mit der Stimulation am Tag 0 erhielten, signifikant. Die 3 unabhängigen Messungen der TOAG-1 mRNA von CD8⁺ T-Zellen schwankten zu sehr, um statistische Signifikanz zu erreichen, zeigten jedoch die gleiche Tendenz. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in Gesamt-PBMCs, zeigten isolierte T-Zellsubtypen zusätzlich auch eine verstärkte TOAG-1-Expression, wenn Alefacept 3 Tage nach allogener Stimulation verabreicht wurde. Alle drei untersuchten T-Zellsubtypen reagierten demnach mit vergleichbarer Regulation von TOAG-1 auf die *in vitro* Behandlung mit Alefacept. Daher kann anhand der Regulation der TOAG-1-mRNA-Expression *in vitro* nicht bestätigt werden, dass Alefacept vornehmlich auf memory T-Zellen wirkt.

Der Unterschied bezüglich der RHAMM-mRNA-Expression zwischen Alefacept behandelten T-Zellsubtypen und den unbehandelten Kontrollen war ebenfalls am deutlichsten, wenn die Behandlung gleichzeitig mit der allogenen Stimulation erfolgte (Abbildung 20 C). Vor allem memory und naive CD4⁺ T-Zellen zeigten eine starke Reduktion der RHAMM-mRNA-Expression nach Alefacept-Gabe am Tag 0 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In naiven CD4⁺ T-Zellen war die verminderte RHAMM Transkription aufgrund der hohen Standardabweichung der unbehandelten Kontrolle nicht signifikant. Der Einfluss von Alefacept auf die RHAMM-mRNA-Expression naiver CD4⁺ T-Zellen war unabhängig vom Applikationszeitpunkt. CD8⁺ T-Zellen zeigten eine schwache Reduktion der RHAMM Transkription nach *in vitro* Behandlung mit Alefacept am Tag 0 und am Tag 3 der Ko-Kultur. Beides erreichte keine statistische Signifikanz. Somit reduzierte Alefacept, am Tag 0 verabreicht, die RHAMM-mRNA-Expression von memory CD4⁺ T-Zellen signifikant im Gegensatz zu naiven CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen. Daher unterstützt die veränderte Transkription von RHAMM die Annahme, dass Alefacept verstärkt auf memory T-Zellen wirkt.

Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 in Proben Alefacept behandelter Psoriasis-Patienten wurde zuvor von Haider *et al.* untersucht (43). Sie konnten zeigen, dass CD69 bereits vor Beginn der Alefacept-Therapie zwischen den Patienten, die ausreichend auf Alefacept ansprachen und solchen, mit unzureichender Besserung unterschiedlich reguliert war. Da Alefacept einen Teil des 2. Signals der T-Zellaktivierung blockiert, sollten behandelte T-Zellen CD69 weitaus geringer exprimieren als unbehandelte, allogene stimulierte T-Zellen. Tatsächlich reduzierte Alefacept die mRNA-Expression von CD69 in allen untersuchten T-Zellsubtypen (Abbildung 20 D). Diese Reduktion war erneut am stärksten ausgeprägt, wenn Alefacept gleichzeitig mit der allogenen Stimulation verabreicht wurde. Dieser Unterschied war nicht

signifikant und es war keine verstärkte Verminderung der CD69-Transkription von memory T-Zellen am Tag 4 nach allogener Stimulation erkennbar. Da memory T-Zellen CD2 in hoher Dichte exprimieren, sollte Alefacept, das CD2 bindet, verstärkt die Aktivierung dieser memory T-Zellen blockieren. Somit war die CD69-Expression möglicherweise unabhängig von der Aktivierungs-hemmenden Wirkung von Alefacept.

Alefacept veränderte demnach in erster Linie die Transkription von TOAG-1 und RHAMM und weniger die von CD69 nach allogener Stimulation *in vitro* gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Diese Unterschiede waren teilweise signifikant und am deutlichsten, wenn Alefacept zeitgleich mit dem allogenen Stimulus verabreicht wurde. Die *in vitro* Behandlung mit Alefacept drei Tage nach erfolgter allogener Stimulation, führte ebenfalls zu einer veränderten mRNA-Expression von TOAG-1 und RHAMM, war aber nicht so stark ausgeprägt und daher nicht signifikant. Demnach vermittelte die Blockierung der Ko-Stimulation während der T-Zellaktivierung entweder den stärksten Effekt bei der Wirkung von Alefacept oder die Granzym B induzierte Apoptose durch die Bindung des Fc γ RIII hatte weniger Einfluss auf die Transkription der untersuchten Markergene.

Zusätzlich wurden alle drei T-Zellsubtypen nach allogener Stimulation und der Alefacept-Behandlung ab Tag 0 oder ab Tag 3 hinsichtlich ihres mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und ihrer Apoptoseneigung untersucht. Die durchflusszytometrische Messung von TMRM bzw. Annexin-V-gefärbten Zellen erfolgte fünf Tage nach der allogenen Stimulation mit CD3-depletierten PBMCs. Es zeigte sich, dass unbehandelte naive und memory CD4⁺ T-Zellen ein vergleichbares mitochondriales Membranpotential aufwiesen (Abbildung 21 C-F). Der Anteil der CD4⁺ T-Zellen mit geringem $\Delta\Psi_m$ betrug etwa 10 %. Im Gegensatz dazu, zeigten ca. 70 % der unbehandelten, allogen stimulierten CD8⁺ T-Zellen ein geringes Membranpotential (Abbildung 21 A, B). Dieser Anteil wurde durch die Alefacept-Behandlung ab Tag 0 oder 3 noch weiter auf ca. 80 % gesteigert, erreichte aber keine statistische Signifikanz. Möglich ist, dass CD8⁺ T-Zellen in der MLC nicht so effektiv aktiviert wurden wie Kulturen mit CD4⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen benötigen für die Aktivierung die Unterstützung von CD4⁺ T-Zellen, weshalb ihre Aktivierung möglicherweise längere Zeit benötigt (102). Das $\Delta\Psi_m$ naiver und memory CD4⁺ T-Zellen wurde stärker durch die *in vitro* Alefacept-Behandlung beeinflusst als das der CD8⁺ T-Zellen. Bei zeitgleicher Applikation von Alefacept mit der allogenen Stimulation am Tag 0, verdoppelte sich der Anteil der CD4⁺ T-Zellen mit verringertem $\Delta\Psi_m$ gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Die Zugabe von Alefacept drei Tage nach allogener Stimulation verursachte ebenfalls einen Anstieg der CD4⁺ T-Zellen mit verringerter TMRM-Färbung, erreichte jedoch nicht das gleiche

Ausmaß. Obwohl naive und memory CD4⁺ T-Zellen identische Tendenzen aufwiesen, waren diese Beobachtungen nur in naiven CD4⁺ T-Zellen, unabhängig vom Zeitpunkt der Alefacept-Gabe, statistisch signifikant. Dies kann durch eine verstärkte Varianz innerhalb der 3 unabhängigen Experimente mit memory CD4⁺ T-Zellen erklärt werden. Es wurde sehr deutlich, dass sich CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen stark bezüglich des mitochondrialen Membranpotentials unterscheiden. Jedoch zeigten alle drei untersuchten T-Zellsubtypen durch die Behandlung mit Alefacept ein verringertes $\Delta\Psi_m$ gegenüber allogenen stimulierten aber unbehandelten T-Zellen.

Interessanterweise zeigten alle drei untersuchten T-Zellsubtypen auch die gleichen Tendenzen bezüglich der Apoptoseneigung. Zwischen 10- 20 % der unbehandelten allogenen stimulierten T-Zellen waren Annexin-V positiv und somit apoptotisch. Dieser Anteil wurde durch die Alefacept-Behandlung in allen drei untersuchten Subtypen erhöht. Die Stimulationen, die erst nach drei Tagen mit Alefacept behandelt wurden, zeigten den jeweils höchsten Anteil von Annexin-V positiven T-Zellen. Dieser Unterschied war sowohl in naiven als auch in memory CD4⁺ T-Zellen signifikant. Im Gegensatz zu naiven CD4⁺ T-Zellen, war der Einfluss von Alefacept ab Tag 0 auf CD8⁺ und memory CD4⁺ T-Zellen nur geringfügig schwächer als nach Behandlung ab Tag 3. Einzig in CD8⁺ T-Zellen waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant. Möglicherweise induziert Alefacept zeitnah nach Applikation Apoptose in T-Zellen. Da die Messung immer am Tag 5 durchgeführt wurde, war die Zeitspanne zwischen Behandlung und Messung in den Kulturen, die erst am Tag 3 mit Alefacept behandelt wurden, kürzer und somit der gemessene Effekt stärker. Diese Ergebnisse zeigen, dass Alefacept in allogenen stimulierten T-Zellen Apoptose auslöst. Haider *et al.* (43) zeigten in einer ähnlichen Studie dass Alefacept keine Apoptose induziert. Sie analysierten jedoch unstimulierte PBMCs gesunder Spender und hatten daher einen anderen Ausgangspunkt. Dementsprechend induziert Alefacept Apoptose in stimulierten PBMCs, jedoch nicht in unstimulierten. Dies wirft die Frage auf, durch welchen Mechanismus Alefacept nur auf aktivierte T-Zellen Apoptose-induzierend wirkt. Vorstellbar ist, dass die verstärkte Expression von CD2 durch aktivierte T-Zellen für diesen Effekt verantwortlich ist. Jedoch konnten bezüglich der Wirksamkeit von Alefacept auch kaum Unterschiede zwischen naiven und memory CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden. Möglich ist daher, dass die CD2 Dichte *in vitro* keinen starken Einfluss hat und ein weiterer Mechanismus dafür ursächlich ist. Verursacht oder verstärkt Alefacept beispielsweise den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD), so ist auszuschließen, dass nicht aktivierte bzw. unstimulierte T-Zellen davon betroffen sind.

Die Abhängigkeit der Alefacept-Wirkung von der Anwesenheit Antigen-präsentierender Zellen (APZ) sollte ebenfalls untersucht werden. Da Alefacept die Proliferation von PBMCs in

Anwesenheit von allogenen CD3-depletierten PBMCs hemmt (Abbildung 17), wurden humane, naive CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von APZ aktiviert und somit zur Proliferation angeregt. Hierfür wurde mit immobilisierten anti-humanen CD3/CD28-Antikörpern stimuliert. Zeitgleich wurden die naiven CD4⁺ T-Zellen mit löslichem oder ebenfalls immobilisiertem Alefacept behandelt. Zwei Tage später wurde die Proliferation mittels ³H-Thymidin Einlagerung analysiert. Weder lösliches-, noch immobilisiertes Alefacept konnte die Proliferation nach T-Zellaktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen, in Abwesenheit von APZ, hemmen (Abbildung 23).

Durch die zusätzliche Quervernetzung von löslichem Alefacept über einen anti-humanen IgG1-Antikörper sollte der Einfluss der Bindung an das Fc-Fragment von Alefacept analysiert werden. Auch die Quervernetzung von Alefacept konnte jedoch die Proliferation gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht hemmen (Abbildung 24). Die *in vitro* Stimulation mit anti-humanen CD3/CD28-Antikörpern ohne APZ, führte zum Verlust der mRNS-Expression von TOAG-1 und zur Induktion der RHAMM Transkription (Abbildung 25). Diese Ergebnisse korrelierten mit der veränderten Transkription nach Stimulation durch allogene APZ (Abbildung 18). Die Alefacept-Gabe verstärkte in Anwesenheit von APZ die TOAG-1-mRNS-Expression und reduzierte die RHAMM Expression im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle. Nach alleiniger Stimulation durch anti-human CD3/CD28-Antikörper konnte jedoch weder die Reduktion der TOAG-1 mRNS, noch die verstärkte RHAMM Transkription durch die Behandlung mit löslichem oder immobilisiertem Alefacept abgeschwächt werden. Daher scheint die Interaktion mit APZ essentiell für die Wirkung von Alefacept zu sein.

Eine mögliche Ursache dafür könnte die Notwendigkeit einer negativen Ko-Stimulation darstellen. Beispielsweise könnte die ausbleibende Bindung von LFA-3 einer APZ an CD2 der T-Zelle nicht nur die Transkription und Expression der T-Zelle beeinflussen, sondern auch die der APZ. Daher wurde ein wichtiger negative Ko-Stimulator, die Oberflächenexpression von PD-L1, bezüglich seiner Beeinflussbarkeit durch Alefacept untersucht. In Abbildung 26 ist dargestellt, dass sowohl CD4⁺ T-Zellen, als auch APZ diesen Liganden fünf Tage nach erfolgter allogener Stimulation exprimieren. Die erneute durchflusszytometrische Analyse von zeitgleich allogenen stimulierten und Alefacept-behandelten CD4⁺ T-Zellen zeigte am Tag fünf eine gesteigerte Expression von PD-L1 auf APZ und CD4⁺ T-Zellen. Die Zunahme der PD-L1-Expression auf APZ durch Alefacept war statistisch signifikant. Die Hemmung der Proliferation von allogenen stimulierten PBMCs durch Alefacept wurde durch die zusätzliche Behandlung mit einem anti-human PD-L1-Antikörper teilweise aufgehoben. Blockiertes PD-L1 auf APZ konnte demnach nicht an PD1 aktivierter T-Zellen binden und ihre Proliferation hemmen. Dieser Effekt

war dosisabhängig (siehe Abbildung 27) und zeigt, dass die Wirkung von Alefacept auch mit der negativen Ko-Stimulation verknüpft sein kann.

Der mögliche Einfluss von PD-L1 ist in einem Modell in Abbildung 33 dargestellt. Möglich ist demnach, dass eine Bindung des TZR an das Antigen-präsentierende MHC Molekül der APZ ohne die Ko-Stimulation vermittelt durch die Bindung von LFA-3 an CD2 der T-Zelle, die vermehrte Expression von negativen ko-stimulatorischen Molekülen, wie PD-L1, auf den APZ verursacht.

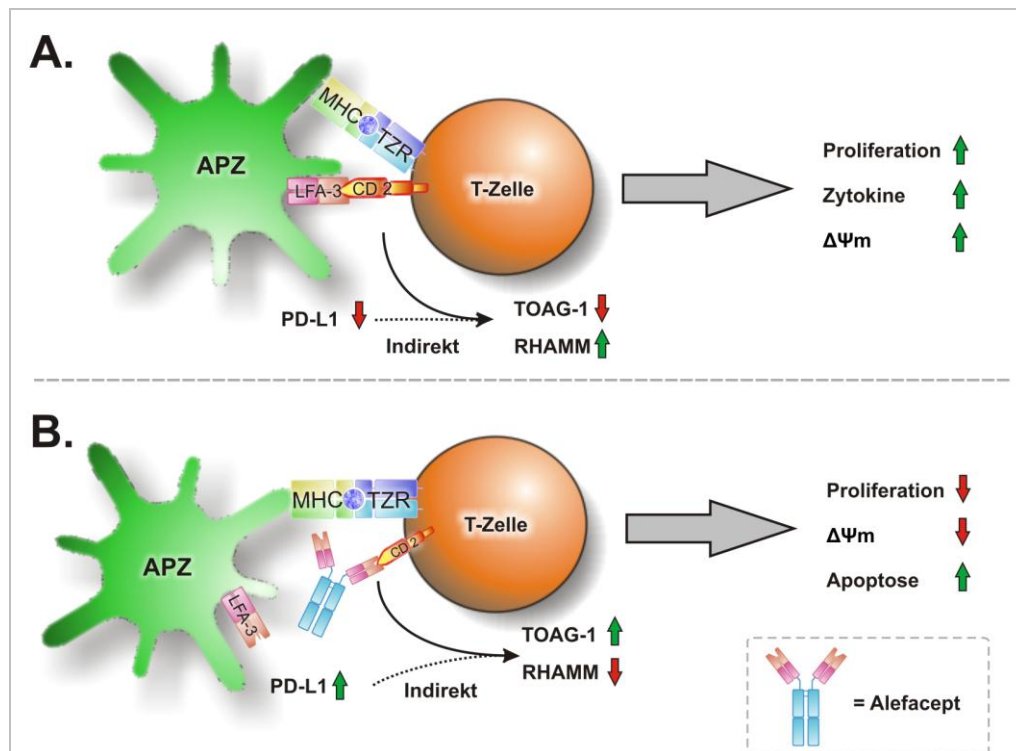


Abbildung 33: Modell des möglichen Einflusses von PD-L1 auf die Wechselwirkung zwischen APZ und T-Zelle und auf die Transkription von TOAG-1 und RHAMM bei allogener Stimulation mit und ohne Alefacept-Behandlung .

A stellt schematisch die allogene Aktivierung einer T-Zelle ohne weitere Behandlung dar. **B** beschreibt die Auswirkungen einer Alefacept-Behandlung in Anwesenheit von allogenen APZ. Es sind die Effekte auf die mRNS-Expression von TOAG-1 und RHAMM und der Einfluss auf die Proliferation, die Zytokinausschüttung, das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) und die Apoptose der T-Zelle aufgezeigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die Überexpression von TOAG-1 zu verringertem mitochondrialem Membranpotential und vermehrter Apoptoseneigung führte, sondern auch die *in vitro* Behandlung mit Alefacept. Dies ist möglicherweise mit der Bindung von NK-Zellen über ihren Fc γ RIII an das Fc-Fragment von Alefacept zu erklären. Denn diese Bindung stimuliert die NK-Zelle in Anwesenheit weiterer ko-aktivierender Signale oder nach Stimulation mit IL-2 zur Ausschüttung von Granzym B, welches von der, über Alefacept-gebundenen, T-Zelle aufgenommen wird (103). Dort aktiviert Granzym B entweder direkt Caspase 3 oder spaltet das pro-apoptotische Protein Bid und leitet somit dessen Translokation vom Zytosol in

das Mitochondrium ein. Dieser Prozess ist essentiell für die durch Granzym B induzierte Apoptose und ist Caspase 8 und somit AICD unabhängig (104, 105), denn Granzym B spaltet Bid direkt und an anderer Stelle als Caspase 8. Am Mitochondrium interagiert das so gespaltene Bid entweder mit dem ebenfalls pro-apoptotischen Protein Bax, welches sich in die äußere Mitochondrienmembran integriert oder hebt eine Blockade von Bax/Bak durch Bcl2 auf (106). Dabei sinkt das mitochondriale Membranpotential und die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran wird ausgelöst. Anschließend wird Cytochrom c freigesetzt und der programmierte Tod der T-Zelle ist die unmittelbare Folge. Wenn Alefacept über die FcγRIII Bindung auch AICD-unabhängige Apoptose auslöst, sollten auch unstimulierte PBMCs apoptotisch werden. Jedoch konnten Haider *et al.* in unstimulierten PBMCs keine Apoptose-Induktion durch Alefacept feststellen (43). Dies ist vermutlich auf die ruhenden NK-Zellen in den unstimulierten Kulturen zurückzuführen. Ruhende NK-Zellen benötigen neben der FcγRIII Stimulation, weitere ko-aktivierende Signale, um Zytotoxizität zu vermitteln. Die alleinige Stimulation des FcγRIII durch IgG induziert zwar die Granzym B Degranulation aber nicht die Polymerisation in die Zielzelle und induziert somit keine Zytotoxizität oder Apoptose (103). Die Expression der dazu benötigten Rezeptoren, beispielsweise LFA-1, wird durch die Anwesenheit allogener APZ angeregt. Auch eine erhöhte IL-2 Konzentration die Expression dieser ko-aktivierenden Rezeptoren aus. Auch T-Zellen, die durch CD3/CD28-Stimulation aktiviert werden, sezernieren verstärkt IL-2. Alefacept verursachte in so aktivierten T-Zellen keine Proliferationshemmung oder veränderte Transkription von TOAG-1. Dies könnte aber auch auf die Abwesenheit von NK-Zellen in unsrem Versuchsaufbau zurückzuführen. Ob die AICD-unabhängige Apoptose durch Granzym B bei der Wirkung von Alefacept ebenfalls eine Rolle spielt, müsste daher nach polyklonaler Aktivierung von T-Zellen in Anwesenheit von NK-Zellen untersucht werden.

Im Rahmen der Revision zur Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der aktiven Caspasen nach Alefacept-Behandlung *in vitro* durchgeführt. Diese zeigte, dass sowohl die Caspasen 3/7, als auch die Caspase 8 durch die Alefacept-Behandlung verstärkt aktiviert wurden (107). Daher scheint Alefacept auch den AICD zu verstärken, der Caspase 8- abhängig ist (siehe Abbildung 3). Die Caspasen 3/7 sind mit beiden Apoptosewegen (intrinsisch und extrinsisch) assoziiert. Somit kann die intrinsischen Apoptose durchaus auch eine Rolle bei der Wirkung von Alefacept spielen, jedoch wird dies durch diese Ergebnisse nicht explizit bewiesen.

Die TOAG-1-Transkription war nach T-Zellaktivierung transient herab reguliert und erreichte 4 Tage nach allogener Stimulation wieder ihr Ausgangsniveau. Möglicherweise setzt zu diesem

Zeitpunkt auch in unbehandelten Kulturen der AICD ein, um eine Überreaktion der Immunantwort zu verhindern. Da das TOAG-1 Protein mitochondrial lokalisiert ist und nach Alefacept-Behandlung verstärkt transkribiert wurde, besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass TOAG-1 bei der Interaktion mit Bax zur Apoptose-Induktion am Mitochondrium beiträgt. Eine Analyse der Bax-mRNS-Expression im Vergleich zur TOAG-1-Transkription oder Immunpräzipitationsexperimente könnten dazu beitragen, einen möglichen Zusammenhang zwischen beiden Proteinen nachzuweisen oder auszuschließen. Auch der Einfluss einer Hemmung der TOAG-1-Transkription auf die Bax-Expression und die Apoptose-Induktion durch den Einsatz von siRNS (small interfering RNS) könnte weiteren Aufschluss über zugrunde liegenden Mechanismen geben.

5.3 Alefacept-Studie an Psoriasis-Patienten

Das primäre Ziel dieser Studie, in der Psoriasis-Patienten mit Alefacept behandelt wurden, war es, die Symptome zu reduzieren und den Krankheitsverlauf unter Therapie zu dokumentieren. Weiterhin sollten Biomarker identifiziert werden, anhand derer das Ausmaß der PASI-Reduktion frühzeitig während der Therapie vorhergesagt werden kann. Hierbei sollte das Potential von TOAG-1 als Biomarker während einer solchen immunmodulatorischen Therapie analysiert werden. TOAG-1 hat sich bereits in einer vorangegangenen Studie als vielversprechender Kandidatenmarker erwiesen.

Es wurden 20 Patienten mit mittlerer bis schwerer Psoriasis (PASI: 7-36) über einen Zeitraum von 3 Monaten mit Alefacept-Therapiert. Sie erhielten einmal wöchentlich 15 mg Alefacept i. m. Zusätzlich wurde ihr PASI ermittelt und jeweils eine Blutprobe entnommen. Eine erfolgreiche Therapie war in dieser Studie durch eine PASI-Reduktion von mindestens 50 % definiert. Übereinstimmend mit anderen Studien (99, 108, 109) reagierten alle Patienten mit einer Reduktion des PASI. Wobei etwa die Hälfte (9 von 20) der Studienteilnehmer eine PASI-Reduktion von mehr als 50 % und ein Viertel der Patienten (5 von 20) eine PASI-Reduktion von ≥ 75 % bis zum Ende der Therapie zeigten (siehe Tabelle 9). Eine statistisch gesicherte Aussage über den Therapieausgang konnte anhand des PASI-Wertes erst in Woche 9 der Therapie getroffen werden (siehe Abbildung 28). Die statistische Analyse von Geschlecht (p-Wert = 0.206), Alter (p-Wert = 0.094), und PASI vor Beginn der Therapie (p-Wert = 0.569) konnte keine Relevanz bezüglich des Therapieansprechens aufzeigen. Zu Beginn und zum Ende der Therapie wurde das Blut der Patienten auf den Anteil von memory T-Zellen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubpopulationen untersucht. Es wurde bereits gezeigt, dass Alefacept den Anteil

von CD8⁺ T-Zellen stärker in Patienten mit Therapieerfolg reduziert (43). Darüber hinaus ist beschrieben, das Alefacept insbesondere auf memory T-Zellen wirkt (38, 39).

In unserer Studie sank der Gehalt von memory (CD45RO⁺ und CD2⁺⁺ exprimierenden) CD4⁺ T-Zellen sowohl in erfolgreich therapierten Patienten, als auch in Patienten mit ungenügendem Therapieerfolg in gleichem Maße. Wohingegen die Reduktion von memory CD8⁺ T-Zellen von erfolgreich therapierten Patienten stärker war, als in Patienten, die mit weniger als 50 % PASI-Reduktion auf Alefacept reagierten. CD8⁺ T-Zellen waren nach *in vitro* Behandlung mit Alefacept jedoch weniger Apoptose-anfällig als CD4⁺ T-Zellen. Möglicherweise werden CD8⁺ T-Zellen *in vitro* schlechter aktiviert als *in vivo*. Das generell niedrige mitochondriale Membranpotential von CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation gegenüber dem stärkeren $\Delta\Psi_m$ von CD4⁺ T-Zellen unterstützt diese Vermutung.

Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren jedoch weder bezüglich der Reduktion von CD8⁺ noch bezüglich der Verminderung von CD4⁺ T-Zellen signifikant (siehe Abbildung 29). Der Anteil der untersuchten T-Zellsubpopulationen war jedoch zum Ende der Alefacept-Behandlung signifikant geringer als vor Therapiebeginn.

Auch Patienten, deren Symptomreduktion unter 50 % des initialen PASI blieb, zeigten eine Verbesserung Ihres Hautbildes unter der Behandlung mit Alefacept. Daher stellte sich die Frage, ob die Änderung der Transkription von TOAG-1 und anderen Genen frühzeitig zwischen erfolgreich therapierbaren Patienten und solchen, deren PASI-Reduktion unter dem definierten Therapieerfolg bleiben wird, unterscheiden kann. Zu diesem Zweck wurden die peripheren Blutzellen aller Patienten während der Therapie bezüglich ihrer mRNS-Expression von TOAG-1 und weiteren Markergenen, in erster Linie RHAMM, untersucht. Die Transkription beider Gene konnte in früheren Studien erfolgreich als Biomarker für die Toleranzinduktion durch Immunmodulation im allogenen Nieren- bzw. Herztransplantations-Modell der Ratte und der Maus verwendet werden (44). Eine stabile TOAG-1-mRNS-Expression zeigte hierbei das Überleben des Transplantats an, während der drastische Verlust der TOAG-1 mRNS einer Abstoßung voranging. Eine starke Induktion der RHAMM Transkription ging ebenfalls mit der Abstoßungsreaktion einher.

Während der Alefacept-Behandlung war sowohl die TOAG-1 als auch die RHAMM-mRNS-Expression eng mit dem Therapieansprechen verknüpft. So zeigten erfolgreich behandelte Patienten besonders in den ersten Wochen der Alefacept-Therapie einen Anstieg der TOAG-1-Transkription im Vergleich zur Expression vor Therapiebeginn. In Patienten, die nicht ausreichend stark auf die Behandlung mit Alefacept ansprachen, war dieser Anstieg nicht zu beobachten. Daraus ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen

bezüglich der TOAG-1-Transkriptionsänderung in den Wochen zwei und vier nach Therapiebeginn (siehe Abbildung 30 A). Die Analyse der ROC-Kurve offenbarte eine hohe Sensitivität (0,889) und Spezifität (0,909) mit der die TOAG-1-Transkription beide Gruppen in Woche zwei voneinander abgrenzte. Die mRNA-Expression von RHAMM blieb in den PBMCs erfolgreich therapierter Patienten etwa konstant. Im Gegensatz dazu zeigten Patienten ohne ausreichenden Therapieerfolg einen starken Anstieg der RHAMM Transkription, der bis zum Ende der Therapie zu beobachten war. Die ROC-Kurve verdeutlichte die Sensitivität von 0,7 bei der maximalen Spezifität von 1 mit der die RHAMM Expression beide Patientengruppen frühzeitig und statistisch signifikant voneinander unterscheiden konnte (siehe Abbildung 30 C, D). RHAMM war über den gesamten Behandlungszeitraum zwischen erfolgreich und unzureichend therapierten Patienten verschieden reguliert. Der Anstieg von TOAG-1 in erfolgreich therapierten Patienten war transient und schwächte sich nach 5wöchiger Therapie wieder ab. Daher konnte die Qualität der Unterscheidung über den gesamten Therapiezeitraum durch die Kalkulation einer Ratio aus TOAG-1 und RHAMM verbessert werden (siehe Abbildung 30 E, F). Beide Markergene wurden bisher noch nicht im Zusammenhang mit chronischer T-Zellaktivierung während der Psoriasis beschrieben. Jedoch war die TOAG-1-Transkription nach allogener Stimulation von humanen PBMCs stark verringert (siehe Kapitel 4.2.2). Diese *in vitro* Behandlung mit Alefacept konnte die TOAG-1-mRNA-Expression stabilisieren und führte, ähnlich wie die Überexpression von TOAG-1, zu verringertem mitochondrialen Membranpotential und verstärkter Apoptose (siehe Kapitel 4.2). Daher ist ein Einfluss von TOAG-1 auf den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) von T-Zellen sehr wahrscheinlich. Nach dem Pathogenese-Modell der Psoriasis von Sabat *et al.* (12) befinden sich Patienten mit offensichtlichen Symptomen der Psoriasis bereits in der Effektorphase der Erkrankung. Sie ist durch Infiltration und Aktivierung von Immunzellen in der Haut charakterisiert und führt so zur verstärkten Proliferation und gestörten Reifung der Keratinozyten. Daher scheint bei der Psoriasis der AICD nicht oder nur unzureichend ausgelöst zu werden. Vermutlich hängt das mit der chronischen Stimulation der T-Zellen zusammen, wie unter Kapitel 1.4.2 beschrieben wurde.

Die TOAG-1-Transkriptionsänderung korrelierte mit der Effektivität der Alefacept-Behandlung. Bei Patienten mit gutem Therapieansprechen scheint Alefacept in den ersten 5 Wochen der Therapie die Apoptose der chronisch aktivierten T-Zellen zu ermöglichen, was ebenfalls durch eine stabile TOAG-1-mRNA-Transkription charakterisiert ist. Im weiteren Verlauf wird die Rekrutierung und Aktivierung weiterer T-Zellen durch die Blockade der Ko-Stimulation vermindert und die TOAG-1-Transkription verringert sich auf das Maß vor Therapiebeginn da

keine weitere verstärkte Apoptose mehr nötig ist. Patienten hingegen, die nicht ausreichend auf die Alefacept-Behandlung reagierten, zeigten diesen Anstieg der TOAG-1-mRNS-Expression kaum oder gar nicht. Dies könnte auf eine ineffiziente Apoptose-Induktion in diesen Patienten hinweisen. Dennoch verringerte sich die Anzahl der CD2⁺⁺ T-Zellen in beiden Patientengruppen vergleichbar stark. Möglicherweise hängt das mit den anti-CD2-Antikörpern für die durchflusszytometrische Analyse zusammen, da sie mit Alefacept um die CD2 Bindungsstellen konkurrieren.

Die mRNS-Expression von RHAMM war in nicht erfolgreich therapierten Patienten über den gesamten Therapiezeitraum erhöht. RHAMM (= CD168) ist ein Rezeptor für Hyaluronan und für die zielgerichtete Bewegung von Zellen erforderlich (45). Die Interaktion zwischen RHAMM und Hyaluronan spielt unter anderem eine besondere Rolle bei der Aktivierung von Protein-Tyrosinekinasen (PTK), die verschiedenste Prozesse, wie Differenzierung und Wachstum von Zellen beeinflussen (46, 47). Studien konnten zeigen, dass die Expression von RHAMM durch Makrophagen während der Entzündungsreaktion stark erhöht war (48). Die Blockierung von RHAMM durch einen Antikörper konnte darin die Chemotaxis und die Anzahl der Makrophagen reduzieren. Daher ist die Interaktion zwischen RHAMM und Hyaluronan scheinbar von entscheidender Bedeutung bei der Rekrutierung von Immunzellen. Auch im Maus-Modell der Arthritis ist die Interaktion von Hyaluronan mit seinen Rezeptoren, für die Ausprägung der Entzündung relevant, wie Nedvetzki *et al.* zeigen konnten (49). In der Psoriasis wurde RHAMM bisher nicht beschrieben, jedoch wurden bereits 1987 in Bläschenflüssigkeit von Psoriasis-Läsionen erhöhte Hyaluronanspiegel nachgewiesen (110). Elkayam *et al.* zeigten in einer aktuelleren Studie, dass auch der Serumspiegel des Hyaluronans eine Rolle bei Patienten mit Psoriasis Arthritis spielt. Die Höhe des Hyaluronanspiegels korrelierte dabei positiv mit der Betroffenheit der Haut durch die Erkrankung (111). Daher spricht einiges dafür, dass die Interaktion von Hyaluronan und seinem Rezeptor RHAMM an Entzündungsreaktionen und an der Migration von Immunzellen in den Entzündungsherd beteiligt ist. Beides wurde in der Effektorphase der Psoriasis beobachtet (12). Zusätzlich wirkte sich die *in vitro* Behandlung mit Alefacept stark hemmend und signifikant auf die RHAMM Transkription nach allogener Stimulation aus (Abbildung 19). Die *in vitro* Daten unterstützen die *in vivo* beobachteten Effekte. Darüber hinaus wurden 3 weitere potentielle Markergene auf ihre Eignung hinsichtlich der frühzeitigen Unterscheidung beider Patientengruppen untersucht. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 charakterisiert regulatorische T-Zellen. Die Foxp3-Transkription war in einer Studie von Haider *et al.*, die ebenfalls nach möglichen Markergenen unter Alefacept-Behandlung suchten, bereits 6 h nach Behandlungsbeginn in erfolgreich therapierten Patienten signifikant erhöht

gegenüber Patienten, die nicht ausreichend auf Alefacept reagierten (43). In der vorliegenden Studie exprimierten beide Patientengruppen vor Beginn der Alefacept-Behandlung ein ähnliches Maß an Foxp3. In den Wochen 2 und 3, in denen TOAG-1 und RHAMM bereits signifikant zwischen beiden Patientengruppen unterscheiden konnten, zeigte Foxp3 eine leicht verstärkte mRNA-Expression in erfolgreich therapierten Patienten (Abbildung 31 A). Dieser Unterschied war nicht signifikant, was möglicherweise auch auf die geringe Endzahl der Patienten zurückzuführen war oder auf den späteren Messzeitpunkt. Denn auch Haider *et al.* konnten in Woche 2 der Therapie keine Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen bezüglich der Foxp3-mRNA-Expression detektieren. Weiterhin zeigte eine Arbeit aus 2005, dass regulatorische T-Zellen (CD4⁺, CD25⁺) aus Blut von Psoriasis-Patienten gleiche Foxp3 mRNA-Niveau exprimieren, wie solche von gesunden Probanden. Jedoch zeigten die regulatorischen T-Zellen (Tregs) von Psoriasis-Patienten funktionelle Defizite bei der Hemmung der T-Zell Antwort sowohl nach allogener Stimulation, als auch nach polyklonaler TZR Stimulation (112).

Haider *et al.* untersuchten zusätzlich die Transkription des Aktivierungsmarkers CD69 und zeigten, dass Patienten, die nicht ausreichend gut therapiert werden konnten, bereits vor der Therapie mit Alefacept eine signifikant höhere CD69-mRNA-Expression aufwiesen (43). Dies würde bedeuten, dass man schon vor der Therapie die Eignung des Patienten für die Behandlung mit Alefacept feststellen könnte. Die Analyse der CD69-Transkription nach *in vitro* Behandlung mit Alefacept zeigte einen leichten Rückgang in allen untersuchten T-Zellsubtypen (Abbildung 20). In der vorliegenden *in vivo* Studie zeigten Patienten ohne ausreichenden Therapieerfolg in Woche 0 eine leicht höhere CD69-Transkription, die sich jedoch statistisch nicht signifikant von der CD69-mRNA-Expression erfolgreich therapierter Patienten unterschied. Nach Behandlungsbeginn war zwischen beiden Patientengruppen kein Unterschied in der CD69-Transkription detektierbar (Abbildung 31 B). Erfolgreich therapierte Patienten zeigten in der Folge sogar einen leichten Anstieg der CD69-mRNA-Expression. Auch in der Studie von Haider *et al.* verminderte sich der Unterschied innerhalb der ersten Tage. Cameron *et al.* untersuchten 2003 durchflusszytometrisch die Expression von CD69 auf zirkulierenden T-Zellen von gesunden Probanden und unbehandelten Psoriasis Patienten (113). Sie konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen.

Zusätzlich wurde auch die mRNA-Expression von PD-L1 in allen Patienten vor Therapiebeginn und in den Wochen 2 und 3 untersucht. Die *in vitro* Behandlung mit Alefacept von allogenen stimulierten PBMCs gesunder Spender bewirkte bereits einen Anstieg der PD-L1 Oberflächenexpression sowohl auf APZ, als auch auf CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 26) gegenüber unbehandelter Kontrollen. Zusätzlich konnte die Blockierung von PD-L1 die hemmende

Wirkung von Alefacept auf die Proliferation allogen stimulierter PBMCs abschwächen (Abbildung 27). Weiterhin zeigten Mazanet *et al.* 2002, dass Keratinozyten entzündeter Haut verstärkt PD-L1 exprimieren, wohingegen es kaum in gesunder Haut detektierbar ist. Die Blockade von PD-L1 führte in dieser Studie zu gesteigerter Expression von IL-2 und IFN γ ohne Beeinträchtigung der CD69-Expression (114). Dennoch war die PD-L1-Transkription in unserer Studie in erfolgreich therapierten Patienten vergleichbar mit der mRNA-Expression von Patienten, die nicht ausreichend von der Therapie profitierten (Abbildung 31 C). Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, dass APZ von Psoriasis-Patienten Defizite bei der Induktion der PD-L1 Oberflächenexpression aufweisen oder nur in den APZ der betroffenen Hautarealen eine veränderte PDL-1-mRNA-Expression detektierbar ist. Erst kürzlich wurde für APZ von Patienten, die an aktivem SLE (Systemischer Lupus Erythematoses), einer Autoimmunerkrankung, leiden, eine defizitäre PDL-1-mRNA-Expression, nachgewiesen (115). Zur Abklärung dieser Möglichkeit wäre eine PD-L1-Expressionsanalyse der PBMCs von Psoriasis-Patienten im Vergleich zu gesunden Spender PBMCs, idealerweise auch von betroffenen Hautzellen, notwendig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Studie mit 20 Psoriasis-Patienten sowohl die RHAMM Transkription als auch die TOAG-1-mRNA-Expression geeignet waren, um frühzeitig zwischen Patienten, die gut auf die Alefacept-Therapie ansprachen und solchen, die keinen ausreichenden Therapieerfolg erreichten, zu unterscheiden. Dies korreliert mit den *in vitro* generierten Daten. Allogen stimulierte PBMCs von gesunden Spendern zeigten verringerte TOAG-1 und erhöhte RHAMM-Transkription gegenüber Alefacept behandelten Kulturen. Vorstellbar wäre, dass Alefacept in Patienten ohne ausreichenden Therapieerfolg nur unzureichend Apoptose von Haut-infiltrierenden T-Zellen induzieren kann oder die CD2-Ko-Stimulation nicht effektiv hemmt. Die TOAG-1-Expression sinkt, Immunzellen werden weiterhin in die Hautläsionen rekrutiert und die Expression von RHAMM, dem Rezeptor für Hyaluronan, der vor allem die Migration von Makrophagen steuert, wird stetig weiter induziert. Alle weiteren untersuchten Markergene konnten diese Unterscheidung zu einem so frühen Zeitpunkt (Woche 2 und 3) nicht leisten.

Demzufolge ist die Änderung der mRNA-Expression von RHAMM und TOAG-1 als prädiktiver Marker für den Erfolg einer Alefacept-Therapie bei Psoriasis geeignet. Darüber hinaus verstärkt die Kombination beider Marker in einer Ratio das prädiktive Potential bezüglich des Therapieansprechens.

5.4 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten daraufhin, dass TOAG-1 während der Apoptose von T-Zellen eine Rolle spielt. Es besteht daher die Möglichkeit, dass TOAG-1 am Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD), der die chronische, überschießende Immunantwort vermeiden soll, beteiligt ist. Da TOAG-1 ein mitochondrial-lokalisiertes Protein ist, könnte es an der Integration von Bax in die mitochondriale Membran beteiligt sein und somit ein Bindeglied zwischen dem Rezeptor-vermittelten AICD und dem mitochondrialen Apoptoseweg darstellen. Eine zentrale Rolle bei der Verknüpfung von extrinsischer und intrinsischer Apoptose spielt die Spaltung des BH3-only Proteins Bid zu tBid durch Caspase 8. Auch Granzym B kann Bid Caspase-unabhängig spalten und somit seine Translokation zum Mitochondrium und die Interaktion mit Bax, einem weiteren pro-apoptotischen Protein, einleiten. Zusätzlich könnte TOAG-1 auch direkt an der ROS Produktion beteiligt sein oder die NFAT oder NF- κ B Aktivierung durch Bindung an andere pro-apoptotische, mitochondriale Proteine beeinflussen. Von besonderem Interesse wären hierbei Proteine, die direkt an der Elektronen-Transportkette beteiligt sind. Sowohl nach TOAG-1 Überexpression in murinen T-Zellen, als auch nach Granzym B vermittelter Apoptose humaner T-Zellen durch Alefacept, wurde das mitochondriale Membranpotential verringert und Apoptose induziert. Eine Analyse welche Caspasen nach TOAG-1 Überexpression bzw. Alefacept-Behandlung aktiviert sind, wäre sinnvoll. Da die Überexpression von TOAG-1 die Apoptoseneigung steigerte, sollte die Hemmung seiner Transkription, beispielsweise durch siRNS, die Apoptoseneigung senken. Vorstellbar wäre hierzu ein Vergleich von T-Zellen mit veränderter TOAG-1-Transkription (Überexpression, Hemmung) bezüglich Ihrer Anfälligkeit gegenüber induzierter Apoptose. Durch Zugabe von Staurosporin könnte der intrinsischer Apoptoseweg induziert werden und durch TNF α der extrinsische. Die siRNS, die während dieser Arbeit entworfen wurden, vermochten jedoch nicht die TOAG-1-Transkription zu hemmen (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen der Revision zur Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit, konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro*-Alefacept-Behandlung stimulierter humaner T-Zellen sowohl die Caspasen 3/7, als auch Caspase 8 aktiviert (107). Die Caspasen 3/7 sind mit den beiden Apoptosewegen, dem intrinsischen und dem extrinsischen assoziiert (95) während die Caspase 8 nach Induktion der extrinsischen Apoptose (AICD) aktiviert wird (96). Somit induziert Alefacept sehr wahrscheinlich den AICD aktivierter T-Zellen. Die Alefacept-Behandlung verhinderte eine Reduktion der TOAG-1-Transkription, die durch Aktivierung von T-Zellen ausgelöst wird

(4.2.2). Das weist darauf hin, dass TOAG-1 beim AICD eine Rolle spielt. Das unterstützt unsere Hypothese, dass TOAG-1 an der Verstärkung des extrinsischen AICD, durch die Verknüpfung mit der intrinsischen Apoptose, beteiligt ist.

Es gibt Hinweise für unterschiedliche Isoformen von TOAG-1 aufgrund von verschiedenen Splice-Varianten. Dementsprechend könnte die Analyse von TOAG-1 auf Proteinebene wertvolle Anhaltspunkte geben, insbesondere hinsichtlich der Funktion der jeweiligen TOAG-1 Isoformen. Weiterhin könnte man durch einen TOAG-1 Antikörper, TOAG-1 in verschiedenen T-Zellsuptypen intrazellulär anfärben und so die auf Transkriptionsebene bereits generierten Daten verifizieren. Zusätzlich wären Immunpräzipitationsexperimente möglich. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Produktion von anti-humanen-TOAG-1-Antikörpern durch Immunisierung von Kaninchen mit, an KLH gekoppelten, Peptiden von TOAG-1 angestrebt. Die Antikörper in den Seren der Kaninchen konnten TOAG-1 jedoch im Westernblott nicht spezifisch nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Für die weitere Validierung der Eignung von TOAG-1 als Biomarker sind zwingend klinische Studien größeren Umfangs erforderlich. Da aber bereits bei 20 Patienten statistische Signifikanz mit dem Mann-Whitney U Test erreicht werden konnte, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass dies auch für größer angelegte Studien der Fall sein wird. Sollten sie das Potential von TOAG-1 als Biomarker bestätigen, so wäre dies von Nutzen für Patient, Arzt und Krankenkassen. Der Patient könnte schneller eine für ihn effektive Therapie beginnen und weitere Kosten für die 12-wöchige, kostenintensive Therapie mit Alefacept könnten eingespart werden. Darüber hinaus ist der Mehraufwand für den behandelnden Arzt überschaubar, da ein Monitoring des Patienten bezüglich CD4-T-Zellzahlen bei der Behandlung mit Alefacept bereits empfohlen ist (116).

Möglich und interessant ist ebenfalls die TOAG-1-Transkription während der Therapie der Psoriasis oder anderen Autoimmunerkrankungen mit weiteren Biologika zu analysieren. Eine weitere Fragestellung könnte sein, ob TOAG-1 gleichermaßen prädiktiv für den Erfolg von Therapien mit Zytokin-neutralisierenden Biologika wie für T-Zell-modulierende Biologika ist. Auch das Monitoring immunmodulatorischer Therapien zur Vermeidung von Organabstoßungen, könnte ein mögliches Einsatzgebiet für die TOAG-1-mRNS-Expressionsanalyse sein.

6 Zusammenfassung

Die gezielte Beeinflussung des Immunsystems steht derzeit im Zentrum der Forschung bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Tumoren oder der Vermeidung von Transplantatabstoßungen. Da Patienten auf die Modulation der Immunantwort individuell verschieden reagieren, wirken die meisten dieser Biologika nicht in allen Patienten ausreichend effektiv. Daher ist das Interesse an Biomarkern, welche den Therapieerfolg in dem jeweiligen Patienten frühzeitig anzeigen, denkbar groß. In einer früheren Studie von Sawitzki *et al.* konnten anhand der Genexpression des Toleranz-assoziierte Gens 1 (TOAG-1), bevorstehende Abstoßungsreaktionen nach allogenen Organtransplantationen im Nager-Modell frühzeitig angezeigt werden (44). Da die unterschiedliche Genexpression auch in peripheren Blutleukozyten detektierbar war und die Entnahme von Patientenblut nur wenig invasiv ist, könnte TOAG-1 einen geeigneten Biomarker für das klinische Monitoring darstellen. Daher stand die funktionelle Charakterisierung des weitgehend unbekanntes TOAG-1 in T-Zellen im Fokus dieser Arbeit.

Es konnte gezeigt werden, dass TOAG-1 ein kernkodiertes aber mitochondrial lokalisiertes Protein ist. Seine mRNA-Expression in T-Zellen war nach allogener Stimulation transient vermindert. Die gleichzeitige *in vitro* Behandlung mit verschiedenen immunmodulatorischen Agenzien verhinderte jedoch diesen Verlust der TOAG-1-mRNA-Expression. Die Überexpression von TOAG-1 durch retroviralen Gentransfer verringerte das mitochondriale Membranpotential und verstärkte die Apoptoseneigung primärer muriner PBMCs. Darüber hinaus wurden die Zytokine IFN γ , IL-10 und IL-4 weniger stark sezerniert, als nach Transduktion mit dem Kontrollvirus. Die *in vitro* Behandlung mit dem Biologikum Alefacept hemmte die Proliferation von humanen PBMCs und verhinderte den Verlust der TOAG-1-mRNA-Expression sowohl in naiven und memory CD4⁺ T-Zellen, als auch in CD8⁺ T-Zellen. Auch der, nach allogener Stimulation beobachtete, Anstieg der RHAMM Transkription blieb durch die Alefacept-Behandlung *in vitro* aus. Weiterhin führte die Alefacept-Behandlung, ähnlich wie die Überexpression von TOAG-1, zur Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und zur verstärkten Apoptoseneigung in den drei untersuchten T-Zellsubpopulationen. Jedoch konnte die Alefacept-Gabe nach unspezifischer T-Zellaktivierung durch Stimulation mit anti-CD3/CD28-Antikörpern, weder die Proliferation hemmen, noch die Genexpression von TOAG-1 und RHAMM gegenüber der unbehandelten Kontrolle beeinflussen. Die durchflusszytometrische Analyse des negativen Ko-Stimulators PD-L1 zeigte

eine Induktion auf CD4⁺ T-Zellen und auf APZ nach Alefacept-Behandlung allogener stimulierter PBMCs. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Wirkung von Alefacept von der Anwesenheit von APZ abhängig ist.

Die 12wöchige Alefacept-Behandlung von Psoriasis-Patienten sollte zeigen ob TOAG-1 auch *in vitro* als Biomarker geeignet ist. Die Therapie war in 9 von 20 Patienten erfolgreich. Sie reagierten mit einer PASI-Reduktion von mehr als 50 %. Alle Patienten wiesen nach Therapie einen Verlust von CD4⁺ und CD8⁺ memory T-Zellen auf. Wobei der Verlust von CD8⁺ T-Zellen in erfolgreich therapierten Patienten ausgeprägter, wenn auch nicht signifikant, war. Eine Unterscheidung der Patienten mit und ohne genügenden Therapieerfolg war anhand des PASI erst in Woche 9 möglich. Wohingegen die mRNS-Expression von TOAG-1 bereits in Woche 2 der Therapie signifikant unterschiedlich zwischen beiden Patientengruppen reguliert war. Auch die RHAMM Transkription zeigte schon in Woche 3 signifikante Unterschiede. Die Berechnung einer Ratio aus beiden Markern verstärkte das Unterscheidungspotential weiterhin und erhöhte Spezifität und Sensitivität der Vorhersage. Die weiteren untersuchten Markergene Foxp3, CD69 und PD-L1 waren in den ersten Wochen der Therapie nicht signifikant unterschiedlich reguliert. TOAG-1 ist demnach ein mitochondrial-lokalisiertes Protein, dessen Überexpression verringertes $\Delta\Psi_m$ und verstärkte Apoptose, ähnlich wie die Alefacept-Behandlung *in vitro*, verursacht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass TOAG-1 in die Apoptose aktivierter T-Zellen (AICD) involviert sein könnte. Zusätzlich war die Transkription von TOAG-1 und RHAMM geeignet, um den Therapieerfolg der Alefacept-Behandlung *in vivo* frühzeitig anzuzeigen. Weitere *in vivo* Untersuchungen in einer größeren Patientenkohorte und eventuell die Einbeziehung weiterer Biologika sind sinnvoll.

Schriftenverzeichnis

1. Germain, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002, 2: 309-322.
2. Lin, M. L., Zhan, Y., Villadangos, J. A., and Lew, A. M. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol* 2008, 86: 353-362.
3. Heath, W. R., and Carbone, F. R. Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming. *Curr Opin Immunol* 1999, 11: 314-318.
4. Wingren, A. G., Parra, E., Varga, M., et al. T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit Rev Immunol* 1995, 15: 235-253.
5. Zelante, T., De Luca, A., Bonifazi, P., et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* 2007, 37: 2695-2706.
6. Matsuzaki, G., and Umemura, M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol* 2007, 51: 1139-1147.
7. Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., and Romagnani, S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008, 20: 1361-1368.
8. Hedrick, M. N., Lonsdorf, A. S., Shirakawa, A. K., et al. CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice. *J Clin Invest* 2009, 119: 2317-2329.
9. Piccirillo, C. A. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine* 2008, 43: 395-401.
10. Vandembark, A. A., and Offner, H. Critical evaluation of regulatory T cells in autoimmunity: are the most potent regulatory specificities being ignored? *Immunology* 2008, 125: 1-13.
11. Kosmaczewska, A., Ciszak, L., Potoczek, S., and Frydecka, I. The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008, 56: 181-191.
12. Sabat, R., Philipp, S., Hoflich, C., et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol* 2007, 16: 779-798.
13. Isaaz, S., Baetz, K., Olsen, K., Podack, E., and Griffiths, G. M. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *Eur J Immunol* 1995, 25: 1071-1079.
14. Garcia-Sastre, A., Durbin, R. K., Zheng, H., et al. The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J Virol* 1998, 72: 8550-8558.
15. Bushar, N. D., and Farber, D. L. Recalling the year in memory T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2008, 1143: 212-225.

16. Fife, B. T., and Bluestone, J. A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008, 224: 166-182.
17. Bernard, A., Lamy And, L., and Alberti, I. The two-signal model of T-cell activation after 30 years. *Transplantation* 2002, 73: S31-35.
18. Habicht, A., Kewalaramani, R., Vu, M. D., et al. Striking dichotomy of PD-L1 and PD-L2 pathways in regulating alloreactive CD4(+) and CD8(+) T cells in vivo. *Am J Transplant* 2007, 7: 2683-2692.
19. Latchman, Y. E., Liang, S. C., Wu, Y., et al. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101: 10691-10696.
20. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002, 8: 793-800.
21. Yeretssian, G., Labbe, K., and Saleh, M. Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine* 2008, 43: 380-390.
22. Arnold, R., Brenner, D., Becker, M., Frey, C. R., and Krammer, P. H. How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol* 2006, 36: 1654-1658.
23. Yin, X. M. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 2006, 369: 7-19.
24. Zinkel, S. S., Hurov, K. E., Ong, C., et al. A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell* 2005, 122: 579-591.
25. Zha, J., Weiler, S., Oh, K. J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 2000, 290: 1761-1765.
26. Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H. C., et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 2006, 8: 1348-1358.
27. Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007, 315: 856-859.
28. Hehlhans, T., and Pfeffer, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005, 115: 1-20.
29. First, M. R., Schroeder, T. J., Hurtubise, P. E., et al. Successful retreatment of allograft rejection with OKT3. *Transplantation* 1989, 47: 88-91.
30. O'Neill, J. L., and Kalb, R. E. Ustekinumab in the therapy of chronic plaque psoriasis. *Biologics* 2009, 3: 159-168.
31. Gartehner G, H. R., Thieda P, Jonas B, Lohr KN, Carey T. 2005. Drug Class Review on Targeted Immune Modulators.

32. Papp, K. A. The long-term efficacy and safety of new biological therapies for psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2006, 298: 7-15.
33. Graves, J. E., Nunley, K., and Heffernan, M. P. Off-label uses of biologics in dermatology: rituximab, omalizumab, infliximab, etanercept, adalimumab, efalizumab, and alefacept (part 2 of 2). *J Am Acad Dermatol* 2007, 56: e55-79.
34. Shapira, M. Y., Abdul-Hai, A., Resnick, I. B., et al. Alefacept treatment for refractory chronic extensive GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2008.
35. Shapira, M. Y., Resnick, I. B., Dray, L., et al. A new induction protocol for the control of steroid refractory/dependent acute graft versus host disease with alefacept and tacrolimus. *Cytotherapy* 2009, 11: 61-67.
36. Krueger, G. G., and Callis, K. P. Development and use of alefacept to treat psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2003, 49: S87-97.
37. Hodak, E., and David, M. Alefacept: a review of the literature and practical guidelines for management. *Dermatol Ther* 2004, 17: 383-392.
38. da Silva, A. J., Brickelmaier, M., Majeau, G. R., et al. Alefacept, an immunomodulatory recombinant LFA-3/IgG1 fusion protein, induces CD16 signaling and CD2/CD16-dependent apoptosis of CD2(+) cells. *J Immunol* 2002, 168: 4462-4471.
39. Cooper, J. C., Morgan, G., Harding, S., et al. Alefacept selectively promotes NK cell-mediated deletion of CD45R0+ human T cells. *Eur J Immunol* 2003, 33: 666-675.
40. Ortonne, J. P. Clinical response to alefacept: results of a phase 3 study of intramuscular administration of alefacept in patients with chronic plaque psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003, 17 Suppl 2: 12-16.
41. Chamian, F., and Krueger, J. G. Psoriasis vulgaris: an interplay of T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 2004, 16: 331-337.
42. Chamian, F., Lowes, M. A., Lin, S. L., et al. Alefacept reduces infiltrating T cells, activated dendritic cells, and inflammatory genes in psoriasis vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102: 2075-2080.
43. Haider, A. S., Lowes, M. A., Gardner, H., et al. Novel insight into the agonistic mechanism of alefacept in vivo: differentially expressed genes may serve as biomarkers of response in psoriasis patients. *J Immunol* 2007, 178: 7442-7449.
44. Sawitzki, B., Bushell, A., Steger, U., et al. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant* 2007, 7: 1091-1102.
45. Sherman, L., Sleeman, J., Herrlich, P., and Ponta, H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 1994, 6: 726-733.

46. Hall, C. L., and Turley, E. A. Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis. *J Neurooncol* 1995, 26: 221-229.
47. Tammi, M. I., Day, A. J., and Turley, E. A. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 2002, 277: 4581-4584.
48. Zaman, A., Cui, Z., Foley, J. P., et al. Expression and role of the hyaluronan receptor RHAMM in inflammation after bleomycin injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, 33: 447-454.
49. Nedvetzki, S., Gonen, E., Assayag, N., et al. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101: 18081-18086.
50. Mueller, W., and Herrmann, B. Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med* 1979, 301: 555.
51. Nicolas, J. F., Chamchick, N., Thivolet, J., et al. CD4 antibody treatment of severe psoriasis. *Lancet* 1991, 338: 321.
52. Prinz, J., Braun-Falco, O., Meurer, M., et al. Chimaeric CD4 monoclonal antibody in treatment of generalised pustular psoriasis. *Lancet* 1991, 338: 320-321.
53. Gottlieb, A. B., Lebwohl, M., Shirin, S., et al. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: results of a pilot, multicenter, multiple-dose, placebo-controlled study. *J Am Acad Dermatol* 2000, 43: 595-604.
54. Eedy, D. J., Burrows, D., Bridges, J. M., and Jones, F. G. Clearance of severe psoriasis after allogenic bone marrow transplantation. *Bmj* 1990, 300: 908.
55. Gardembas-Pain, M., Ifrah, N., Foussard, C., et al. Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1990, 126: 1523.
56. Langley, R. G., Krueger, G. G., and Griffiths, C. E. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 2005, 64 Suppl 2: ii18-23; discussion ii24-15.
57. Christophers, E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001, 26: 314-320.
58. Henseler, T., and Christophers, E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985, 13: 450-456.
59. Schon, M. P., and Boehncke, W. H. Psoriasis. *N Engl J Med* 2005, 352: 1899-1912.
60. Leung, D. Y., Travers, J. B., Giorno, R., et al. Evidence for a streptococcal superantigen-driven process in acute guttate psoriasis. *J Clin Invest* 1995, 96: 2106-2112.
61. Solanki, L. S., Srivastava, N., and Singh, S. Superantigens: a brief review with special emphasis on dermatologic diseases. *Dermatol Online J* 2008, 14: 3.

62. Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., et al. V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989, 244: 811-813.
63. Owen, C. M., Chalmers, R. J., O'Sullivan, T., and Griffiths, C. E. A systematic review of antistreptococcal interventions for guttate and chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2001, 145: 886-890.
64. Menssen, A., Trommler, P., Vollmer, S., et al. Evidence for an antigen-specific cellular immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *J Immunol* 1995, 155: 4078-4083.
65. Bos, J. D., Hulsebosch, H. J., Krieg, S. R., Bakker, P. M., and Cormane, R. H. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 1983, 275: 181-189.
66. Robinson, J. H., and Kehoe, M. A. Group A streptococcal M proteins: virulence factors and protective antigens. *Immunol Today* 1992, 13: 362-367.
67. Valdimarsson, H., Sigmundsdottir, H., and Jonsdottir, I. Is psoriasis induced by streptococcal superantigens and maintained by M-protein-specific T cells that cross-react with keratin? *Clin Exp Immunol* 1997, 107 Suppl 1: 21-24.
68. Gudmundsdottir, A. S., Sigmundsdottir, H., Sigurgeirsson, B., et al. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin Exp Immunol* 1999, 117: 580-586.
69. Eyre, R. W., and Krueger, G. G. Response to injury of skin involved and uninvolved with psoriasis, and its relation to disease activity: Koebner and 'reverse' Koebner reactions. *Br J Dermatol* 1982, 106: 153-159.
70. Gudjonsson, J. E., Thorarinsson, A. M., Sigurgeirsson, B., Kristinsson, K. G., and Valdimarsson, H. Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *Br J Dermatol* 2003, 149: 530-534.
71. Tsankov, N., Angelova, I., and Kazandjieva, J. Drug-induced psoriasis. Recognition and management. *Am J Clin Dermatol* 2000, 1: 159-165.
72. Hancock, G. E., Kaplan, G., and Cohn, Z. A. Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells. *J Exp Med* 1988, 168: 1395-1402.
73. Olaniran, A. K., Baker, B. S., Garioch, J. J., Powles, A. V., and Fry, L. A comparison of the stimulatory effects of cytokines on normal and psoriatic keratinocytes in vitro. *Arch Dermatol Res* 1995, 287: 231-236.
74. Friedrich, M., Krammig, S., Henze, M., et al. Flow cytometric characterization of lesional T cells in psoriasis: intracellular cytokine and surface antigen expression indicates an activated, memory/effector type 1 immunophenotype. *Arch Dermatol Res* 2000, 292: 519-521.
75. Zheng, Y., Danilenko, D. M., Valdez, P., et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007, 445: 648-651.

76. Henseler, T., and Schmitt-Rau, K. A comparison between BSA, PASI, PLASI and SAPASI as measures of disease severity and improvement by therapy in patients with psoriasis. *Int J Dermatol* 2008, 47: 1019-1023.
77. Carlin, C. S., Feldman, S. R., Krueger, J. G., Menter, A., and Krueger, G. G. A 50% reduction in the Psoriasis Area and Severity Index (PASI 50) is a clinically significant endpoint in the assessment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2004, 50: 859-866.
78. Griffiths, C. E., Clark, C. M., Chalmers, R. J., Li Wan Po, A., and Williams, H. C. A systematic review of treatments for severe psoriasis. *Health Technol Assess* 2000, 4: 1-125.
79. Nijsten, T., and Lambert, J. Dermatologists' views and opinions about photo(chemo)therapy and conventional systemic psoriasis therapies: results from a Belgian survey. *Dermatology* 2006, 213: 123-133.
80. Weinstein, G. D., and Frost, P. Methotrexate for psoriasis. A new therapeutic schedule. *Arch Dermatol* 1971, 103: 33-38.
81. Sancho, D., Gomez, M., and Sanchez-Madrid, F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 2005, 26: 136-140.
82. Verhagen, J., Akdis, M., Traidl-Hoffmann, C., et al. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 117: 176-183.
83. Perl, A., Gergely, P., Jr., Nagy, G., Koncz, A., and Banki, K. Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends Immunol* 2004, 25: 360-367.
84. Perl, A., Gergely, P., Jr., Puskas, F., and Banki, K. Metabolic switches of T-cell activation and apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 2002, 4: 427-443.
85. Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., and Sheu, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 287: C817-833.
86. Rasola, A., and Geuna, M. A flow cytometry assay simultaneously detects independent apoptotic parameters. *Cytometry* 2001, 45: 151-157.
87. van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C. P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998, 31: 1-9.
88. Tsai, E. Y., Yie, J., Thanos, D., and Goldfeld, A. E. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol Cell Biol* 1996, 16: 5232-5244.
89. Ke, Q., Li, J., Ding, J., et al. Essential role of ROS-mediated NFAT activation in TNF-alpha induction by crystalline silica exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, 291: L257-264.

90. Quintana, A., Griesemer, D., Schwarz, E. C., and Hoth, M. Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflugers Arch* 2005, 450: 1-12.
91. Hoth, M., Button, D. C., and Lewis, R. S. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97: 10607-10612.
92. Hayden, M. S., West, A. P., and Ghosh, S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 2006, 25: 6758-6780.
93. Kurylowicz, A., and Nauman, J. The role of nuclear factor-kappaB in the development of autoimmune diseases: a link between genes and environment. *Acta Biochim Pol* 2008, 55: 629-647.
94. Shelton, S. N., Shawgo, M. E., and Robertson, J. D. Cleavage of bid by executioner caspases mediates feed forward amplification of mitochondrial outer membrane permeabilization during genotoxic stress-induced apoptosis in jurkat cells. *J Biol Chem* 2009.
95. Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 2006, 311: 847-851.
96. Boatright, K. M., and Salvesen, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003, 15: 725-731.
97. Johnson, C. R., and Jarvis, W. D. Caspase-9 regulation: an update. *Apoptosis* 2004, 9: 423-427.
98. Miller, G. T., Hochman, P. S., Meier, W., et al. Specific interaction of lymphocyte function-associated antigen 3 with CD2 can inhibit T cell responses. *J Exp Med* 1993, 178: 211-222.
99. Strober, B. E., and Menon, K. Alefacept for the treatment of psoriasis and other dermatologic diseases. *Dermatol Ther* 2007, 20: 270-276.
100. Gottlieb, A. B. Alefacept is well tolerated in patients with chronic plaque psoriasis. *J Cutan Med Surg* 2004, 8 Suppl 2: 14-19.
101. Shapira, M. Y., Resnick, I. B., Dray, L., et al. A new induction protocol for the control of steroid refractory/dependent acute graft versus host disease with alefacept and tacrolimus. *Cytotherapy* 2009, 1-7.
102. Zhang, S., Zhang, H., and Zhao, J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 384: 405-408.
103. Bryceson, Y. T., and Long, E. O. Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr Opin Immunol* 2008, 20: 344-352.
104. Heibein, J. A., Goping, I. S., Barry, M., et al. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med* 2000, 192: 1391-1402.

105. Barry, M., Heibein, J. A., Pinkoski, M. J., et al. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 2000, 20: 3781-3794.
106. Waterhouse, N. J., Sedelies, K. A., Browne, K. A., et al. A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005, 280: 4476-4482.
107. Keeren, K., Friedrich, M., Gebuhr, I., et al. Expression of Tolerance Associated Gene-1, a Mitochondrial Protein Inhibiting T Cell Activation, Can Be Used to Predict Response to Immune Modulating Therapies. *J Immunol* 2009.
108. Cassetty, C. T., Alexis, A. F., Shupack, J. L., and Strober, B. E. Alefacept in the treatment of psoriatic nail disease: a small case series. *J Am Acad Dermatol* 2005, 52: 1101-1102.
109. Perlmutter, A., Cather, J., Franks, B., Jaracz, E., and Menter, A. Alefacept revisited: Our 3-year clinical experience in 200 patients with chronic plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2008, 58: 116-124.
110. Lundin, A., Engstrom-Laurent, A., Michaelsson, G., and Tengblad, A. High levels of hyaluronate in suction blister fluid from active psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 1987, 116: 335-340.
111. Elkayam, O., Yaron, I., Shirazi, I., Yaron, M., and Caspi, D. Serum levels of hyaluronic acid in patients with psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol* 2000, 19: 455-457.
112. Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E., et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005, 174: 164-173.
113. Cameron, A. L., Kirby, B., and Griffiths, C. E. Circulating natural killer cells in psoriasis. *Br J Dermatol* 2003, 149: 160-164.
114. Mazanet, M. M., and Hughes, C. C. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol* 2002, 169: 3581-3588.
115. Mozaffarian, N., Wiedeman, A. E., and Stevens, A. M. Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express programmed death ligand-1. *Rheumatology (Oxford)* 2008, 47: 1335-1341.
116. Papp, K. A. Monitoring biologics for the treatment of psoriasis. *Clin Dermatol* 2008, 26: 515-521.

Danksagung

Mein Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. H.D. Volk, der mir die Möglichkeit zur Promotion gab. Außerdem möchte ich ganz besonders Frau Dr. Birgit Sawitzki für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die ausgezeichnete Betreuung mit zahlreichen Anregungen und Gesprächen danken. Auch bei Rückschlägen stand mir die „Chefin“ immer mit Rat und Tat zur Seite, meist eingeleitet mit den Worten: „Das ist Forschung“.

Vielen Dank auch an Dr. Christine Brandt und Dr. Erik Kwidzinki für die Unterstützung und Betreuung am Laser-Fluoreszenzmikroskop. Es sind wirklich schöne Bilder geworden, auch ohne Konfokal-Laser-Fluoreszenzmikroskop.

Zusätzlich danke ich Dr. Christian Meisel für seine fachlichen Ratschläge und die Hilfe bei der Durchflusszytometrie für die Psoriasis Studie. Auch Prof. Dr. Wolfram Sterry, Dr. Robert Sabat und besonders Dr. Sandra Philipp gilt mein Dank für ihre Kompetenz in allen Fragen der Dermatologie.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Ida Simon Hauses, insbesondere Katrin Vogt für ihre wertvollen Ratschläge im Labor danken. Vielen Dank auch Dir Steffi für Deine tatkräftige Unterstützung zur Bewältigung der Proben und Deinen Humor. Ich danke auch allen Mit-Doktoranden: Marleen, Juliane, Stephan, Farzin, Mareen, Gordon und Inga für die fachlichen Gespräche aber auch für die tolle Zeit außerhalb des Labors. Außerdem danke ich Sabine, Elke und Heinz. Mit Euch allen hat jeder Tag schon beim Frühstück mit herzhaftem Lachen begonnen.

Zusätzlich möchte ich meinem neuen Arbeitgeber, der Projektgruppe 11 des Robert Koch Instituts und besonders deren Leiterin Dr. Claudia Kücherer für Ihre Geduld während der Anfertigung dieser Dissertationsschrift danken. Auch hier habe ich viele liebe Menschen kennengelernt, die immer ein offenes Ohr hatten. Danke Angelina, Jule und Stephan.

Besonderer Dank gilt meinem Mann Marco für seine Geduld und seine Motivation vor allem während der Anfertigung dieser Dissertationsschrift. Aber auch meinen Eltern danke ich von Herzen für ihre aufmunternden Worte und Unterstützung während meines gesamten Studiums. Ihnen war und ist es immer das Wichtigste, dass ich glücklich bin, ganz gleich in welchem Beruf. Ich hoffe sehr diese Einstellung und Geduld auch meinen Kindern entgegenzubringen.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

- 1 **Gube K***, Langrehr JM*, Hammer MH, Lehmann M, Polenz D, Pascher A, Volk HD, Reinke P (2007): Short-term anti-CD4 plus anti-TNF-alpha receptor treatment in allogeneic small bowel transplantation results in long-term survival. *Transplantation*. Sep 15;84(5):639-46.
* gemeinsame Erstautorenschaft
- 2 **Keeren K**, Friedrich M, Gebuhr I, Philipp S, Sabat R, Sterry W, Brandt C, Meisel C, Grütz G, Volk HD, Sawitzki B (2009): Expression of TOAG-1, a mitochondrial protein regulating T cell activation, can be used to predict response to immune modulating therapies. *Journal of Immunology* (im Druck; Sep 15)
- 3 Brestrich G, Zwinger S, Roemhild A, Kurtz A, Noutsias M, Block A, Rohde M, **Keeren K**, Sawitzki B, Volk HD, Reinke P, Hammer MH (2009): Generation of HCMV-specific T-cell lines from seropositive solid-organ-transplant recipients for adoptive T-cell therapy. *Journal of Immunotherapy* (im Druck)
- 4 Gebuhr I, **Keeren K**, Vogt K, Höflich C, Meisel C, Volk HD, and Sawitzki B (2009) Differential expression and function of α -mannosidase I in allostimulated naive and memory CD4⁺ T cells. (eingereicht)

Erklärung

„Ich, Kathrin Keeren erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Funktionelle Charakterisierung des Toleranz-assoziierten Gens TOAG-1, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

03.09.2009

Kathrin Keeren