

Aus der Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Isolierung, Expansion, Klonierung von T-Lymphozyten aus
Psoriasisplaques sowie Evaluation der T-Zell-Rezeptor-Spezifität –
Definition mittels kombinatorischer Peptidbibliotheken**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marina Wayan Kohlmann

aus Hamburg

Meinen Eltern

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Sterry
2. Prof. Dr. j. C. Prinz
3. Prof. Dr. med. J. C. Simon

Datum der Promotion: 13.10.2008
Datum der Zeugnisübergabe: 21.11.2008

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Psoriasis.....	1
1.2 Die Rolle der T-Lymphozyten bei Psoriasis	2
1.3 Klonale T-Zellexpansion bei Psoriasis.....	3
1.3.1 T-Zell-Rezeptor-Analyse	3
1.3.2 Bedeutung von Superantigenen bei Psoriasis.....	5
1.4 Kombinatorische Peptidbibliotheken (PS-SCL)	6
1.4.1 Identifizierung unbekannter T-Zell-Epitope	6
1.4.2 Kombinatorische Peptidbibliotheken allgemein	6
1.4.2.1 Prinzip der PS-SCL	7
1.4.2.2 Screening der PS-SCL.....	8
1.4.2.3 Einsatz von PS-SCL	8
2 Fragestellung.....	10
3 Material und Methoden	11
3.1 Chemikalien/Reagenzien.....	11
3.1.1 Verwendete Reagenzien.....	11
3.1.2 Zusammensetzungen häufig verwendeter Reagenzien:	11
3.1.3 Verbrauchsmaterialien und verwendete Geräte	12
3.2 Methoden.....	13
3.2.1 Hautbiopsien.....	13
3.2.2 Isolierung von PBMC's.....	13
3.2.3 Aufbereitung der Hautbiopsien	14
3.2.4 Klonierung von CD25 ⁺ Zellen aus psoriatischer Haut	14
3.2.4.1 Identifizierung der ausgewanderten Zellen	14
3.2.4.2 Markierung von CD25 ⁺ Zellen.....	14
3.2.4.3 Zellsortierung	15
3.2.4.3.1 Sortierung CD25 ⁻ Zellen	15
3.2.4.3.2 Sortierung CD25 ⁺ Zellen.....	15
3.2.4.4 FACS-Analyse	16
3.2.4.5 Klonierung der T-Lymphozyten durch sog. „limited-dilution“	16
3.2.4.5.1 Ausplattierung der T-Lymphozyten	16
3.2.4.5.2 Ausplattierung der peptid-gepulsten PBMC	16
3.2.4.6 Expansion der T-Zell Klone.....	17
3.2.5 Klonierung drei Tage nach Sortierung	18
3.2.6 Klonierung von polyklonalen Zellen.....	19
3.2.7 Expansion polyklonaler T-Zell-Linien.....	20
3.2.8 BrdU-Assay.....	21
4 Resultate	23
4.1 Effekte von <i>in vitro</i> Kultivierung auf die Phänotyp-Verteilung von T-Zell-Linien	23
4.2 Beziehung zwischen Krankheitsstatus und T-Zell Phänotyp-Verteilung	24
4.2.1 MACS-Sortierung aktivierter T-Zellen.....	25
4.2.2 Klonierungseffizienz CD25 ⁺ sortierter Zellen.....	27
4.3 Expansion von T-Zell-Klonen aus psoriatischen Plaques.....	28
4.4 Peptidbibliotheken bei polyklonalen T-Zell-Linien.....	31
4.4.1 Expansion polyklonaler T-Zell-Linien.....	31
4.4.2 Stimulation von T-Zell-Linien mit kombinatorischen Peptidbibliotheken <i>in vitro</i>	32
4.4.2.1 Experiment 1	33

4.4.2.2 Experiment 2	36
4.4.2.3 Experiment 3	40
4.4.3 Zusammenfassung der Experimente mit kombinatorischen Peptidbibliotheken	42
5 Diskussion.....	45
5.1 Identifizierung pathogenetisch relevanter T-Zellen	45
5.2 T-Zell-Subpopulationen bei der Psoriasis	46
5.2.1 Immunophänotypische Studien	46
5.2.2 Funktionelle Interaktion zwischen CD4 und CD8 T- Zellen	47
5.3 Beziehung zwischen Krankheitsstatus und T-Zell Phänotyp-Verteilung bei Psoriasis .	48
5.4 Effekte der <i>in vitro</i> Kultivierung auf T-Zellen aus psoriatischen Plaques	49
5.5 Klonierung und Expansion von T- Zellen aus psoriatischen Plaques	49
5.5.1 Verwendung von Apoptoseinhibitoren zur <i>in vitro</i> -Expansion von T-Zell-Klonen	51
5.6 Einsatz kombinatorischer Peptidbibliotheken an polyklonalen T-Zell-Linien	52
5.6.1 Messung der peptid-stimulierten Proliferation polyklonaler T-Zellen.....	53
5.6.2 Expandierung polyklonaler T-Zell-Linien	54
5.6.3 Effekte der Peptidbibliotheken auf polyklonale T-Zell-Linien.....	55
6 Zusammenfassung.....	57
7 Literaturverzeichnis.....	58

Abkürzungen

AICD	activation-induced cell death
AK	Antikörper
APC	Antigen presenting cell(s)
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäuren
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine serum albumin
Caspase	Cysteinyl-Asparaginsäure-Protease
CD	Cluster of differentiation
CLA	cutaneous lymphocyte-associated antigen
DEVD-CHO	selektiver Caspase-3-Inhibitor
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DN	Doppelt negativ
DP	Doppelt positiv
EDTA	Ethylendiamintetraacylacid
FACS	Flourescence activated cell sorting
Fas	entspricht: CD95, APO-1
FITC	Floureszeinthiocyanat
FSC	forward scatter
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
3H-TdR	[3H]Thymidin
HLA	human leukocyte antigen
I-CAM	intercellular cell adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MACS	Magnetic activated cell sorting
MHC	major histocompatibility complex
MnTBAP	manganese [III] tetrakis [5,10, 15, 20-benzoic acid] porphyrin
OKT-3	monoklonaler Antikörper gegen das CD3-Oberflächenantigen
PASI	Psoriasis Area and Severity Index I
PBMC	peripheral blood mononuclear cell(s)
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythin
PerCp	Peridinin-chlorophyll-protein
PHA	Phytohämagglutinin
PS-SCL	Positional Scanning Synthetic Combinatorial Libraries
ROS	reactive oxygen species
SCID	severe combined immunodeficiency
SSC	side scatter
TNF	Tumornekrosefaktor
TZK	T-Zell-Klone
TZL	T-Zell-Linien
TZR	T-Zell-Rezeptor
TZRB(V)	T-Zell-Rezeptor β -Kette (variable Region)
V-CAM	vascular cell adhesion molecule
VDJ	variable Region schwerer Immunglobulinketten

1 Einleitung

1.1 Psoriasis

Psoriasis ist eine multifaktorielle, chronisch inflammatorische Hauterkrankung, von der etwa 2.5% der kaukasischen Bevölkerung betroffen sind (159). An der Pathogenese beteiligt sind genetische, immunologische sowie Umweltfaktoren (26, 101, 138). Bei einem signifikanten Anteil der Patienten (5 - 15%) kommt es zusätzlich zu einer chronischen Arthritis (174). Die Psoriasis ist klinisch durch scharf, aber meist unregelmäßig begrenzte, streckseitenbetonte, erythemosquamöse Herde mit silberglänzender Schuppung gekennzeichnet. Neben der gesteigerten Keratinozytenproliferation führen die Ansammlung neutrophiler Granulozyten in den oberen Epidermisschichten, eine Vermehrung dendritischer Zellen und nicht zuletzt ein Infiltrat mit zahlreichen aktivierten T-Zellen zu den Hautveränderungen. Hinzu kommen entzündliche Gefäßveränderungen, die rein funktioneller Art sind und entweder spontan oder unter Therapie vollständig reversibel sind (121). Der aktuelle klinische Schweregrad eines Psoriasis-Schubes kann anhand des sog. „Psoriasis Area and Severity Index“ (PASI) quantifiziert werden, bei dem Rötung, Verdickung, sowie Schuppung der befallenen Haut an allen betroffenen Körperarealen in einen einzigen Zahlenwert transformiert werden.

Grundsätzlich kann sich die Schuppenflechte in jedem Alter manifestieren. Der Inzidenzgipfel der Erstmanifestation liegt in der zweiten und dritten Lebensdekade (132). 90% der Psoriatiker erkranken vor dem 50. Lebensjahr. Psoriasis tritt in zwei unterschiedlichen Verlaufsformen auf: Typ I- oder Typ II-Psoriasis. Typ I zeigt einen Krankheitsbeginn vor dem 40. Lebensjahr, eine familiäre Häufung und ist von einem schwereren klinischen Verlauf geprägt als die Typ-II-Psoriasis. Es besteht eine genetische Assoziation insbesondere zu HLA-Cw 6. Hier beträgt die Kopplung bis zu 95%. Weniger deutliche Assoziationen bestehen mit HLA-B13, -B17 und -Bw 57, sowie anderen Loci (43). Typ-II-Psoriasis manifestiert sich zumeist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, die Familienanamnese ist leer und eine Assoziation zu den genannten HLA-Varianten besteht nicht. Verlauf und klinisches Erscheinungsbild sind nicht vorhersehbar, chronisch-stabile Phasen können von eruptiven Krankheitsschüben unterbrochen sein und umgekehrt (105).

Trotz zahlreicher Einzelbefunde gibt es noch keine allgemein akzeptierte Theorie der Psoriasispathogenese. Zu den wichtigen pathogenetischen Mechanismen zählen allerdings: die Aktivierung einer dermo-epidermalen Zytokinkaskade (IL-1, IL-8, IL-15, IL-22, IFN-gamma u.a.), eine gesteigerte Adhäsivität dermalen Gefäße für Entzündungszellen, eine Steigerung der

epidermalen Zellproliferation und Ausdifferenzierung, die Infiltration von T-Lymphozyten, die Persistenz CD11c-positiver dendritischer Zellen, sowie das Eindringen von Granulozyten bis unter das Stratum corneum.

1.2 Die Rolle der T-Lymphozyten bei Psoriasis

Lange wurde die Psoriasis wegen der stark gesteigerten Regeneration der Epidermis als eine genuine Proliferationsstörung der Keratinozyten angesehen. Heutzutage wird die Rolle der T-Lymphozyten für die Initiierung und Aufrechterhaltung der Psoriasis durch mehrere experimentelle Hinweise gestützt (14, 108). Den stärksten Hinweis hierfür lieferten klinische Studien zum Einsatz selektiver Lymphozyten-Therapien, die immunsuppressive Medikamente beinhaltet (z.B. Cyclosporin A) (44), Knochenmarks-Transplantation (40) und Lymphozyten-spezifische Medikamente wie z.B. anti-CD3- (169) anti-CD4-Antikörper (96, 117, 126) und das T-Zell-selektive Toxin DAB₃₈₉ IL-2 (156). Die Behandlung mit IL-2 Toxin verbesserte nicht nur die T-Zell-, sondern auch andere epidermale Aberrationen, wie z.B. Keratinozyten-Hyperplasie und Epidermisverdickung (80).

Auch experimentelle Studien weisen auf die wichtige Rolle der T-Zellen in der Krankheitspathogenese hin. Injiziert man aktivierte T-Lymphozyten in menschliche Haut, die auf immundefiziente SCID-Mäuse transplantiert wurde, dann induzieren nur die T-Zellen von Psoriasispatienten, nicht aber von gesunden Probanden psoriasistypische Veränderungen in den Transplantaten (172). Im frühen Verlauf des Krankheitsgeschehens sind aktivierte T-Lymphozyten vermehrt in der läsionalen Haut vertreten (21). Dabei werden die inflammatorischen Infiltrate in psoriatischen Läsionen dominiert von einem Influx an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, welche die Zell-Oberflächenmarker für Aktivierung (CD25 [Interleukin-2 Rezeptor], CD27, CD69) und Gedächtnis-Zellen (CD45RO) exprimieren (22, 50, 93). Die Infiltration dieser T-Zellen ist eines der ersten mikroskopisch erkennbaren Ereignisse bei der Entwicklung psoriatischer Plaques (11, 27).

Auch dendritische Zellen, eine Population antigenpräsentierender Zellen, die in der Lage sind, ruhende T-Zellen sehr effizient zu stimulieren, treten in psoriatischen Plaques verstärkt auf und wandeln diese in den aktivierten Phänotyp um (132). Der T-Zell-Infiltration folgt die klinische Manifestation der Psoriasis, wobei die aktivierten Gedächtniszellen Zytokine wie IL-2 (77), TNF-alpha (139) und IFN-gamma (46) freisetzen, welche die Rekrutierung weiterer

inflammatorischer Zellen und die charakteristischen epidermalen Veränderungen bei Psoriasis stimulieren (7, 15, 23, 50).

Normalerweise geht einer Entzündungsreaktion die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF-alpha und IFN-gamma (128) voraus. Durch Expression von interzellulären und vaskulären Adhäsionsmolekülen (I-CAM und V-CAM) werden noch zusätzlich inflammatorische Zellen rekrutiert. Bei psoriatischen Patienten ist diese Immunantwort auf ein Vielfaches der Norm verstärkt (128). Die stimulierten Keratinozyten treten in eine beschleunigte, aber unvollständige Differenzierung. Dabei exprimieren sie Rezeptoren, die sie für Entzündungssignale empfindlich machen und sezernieren selbst Entzündungsmediatoren. So wird die psoriatische Entzündung durch eine gegenseitige Stimulation zwischen Leukozyten und Keratinozyten unterhalten (105).

Mittlerweile ist gut belegt, dass T-Zellen das komplexe psoriatische Entzündungsbild vermitteln können. So wurde vielfach gezeigt, dass T-Zell-Klone in psoriatischen Plaques expandieren (31, 80, 164) und durch die Freisetzung bestimmter löslicher Faktoren, insbesondere IFN-gamma, die Keratinozytenproliferation stimulieren (118). Diese Botenstoffe können in der Summe ihrer biologischen Eigenschaften alle psoriatischen Einzelaspekte vermitteln, wie die gesteigerte Keratinozytenproliferation durch IL-3, IL-6, IL-19, GM-CSF, IFN-gamma, die Produktion von β -Defensinen durch Keratinozyten (TNF-alpha), die Ansammlung neutrophiler Granulozyten in der Epidermis (IL-8) und von Mastzellen (IL-3, IL-5) in der Dermis (165).

1.3 Klonale T-Zellexpansion bei Psoriasis

Während sich bereits mehrere Studien mit der Etablierung von T-Zell-Linien (TZL) aus psoriatischen Plaques beschäftigt haben (28, 150), existieren nur wenige Daten über T-Zell-Klone, die aus psoriatischen Plaques isoliert wurden. Diese Studien konzentrieren sich in erster Linie auf die IFN-gamma, IL-2, IL-4-Produktion, die Phänotyp-Verteilung und die Reaktion der Klone auf epidermale Extrakte und Streptokokken A-Antigene (69, 106, 118, 165).

Bislang liegen keine Studien über die Effizienz einer T-Zell-Klonierung aus Zellen psoriatischer Plaques vor, welche verschiedene Bedingungen testet, die die T-Zellexpansion *in vitro* beeinflussen.

1.3.1 T-Zell-Rezeptor-Analyse

Um Näheres über unbekannte T-Zell-Stimuli zu erfahren bietet es sich an, den T-Zell-Rezeptor der Lymphozyten in entzündlichen Infiltraten zu analysieren (121). Das Fehlen repetitiver TZR-Rearrangements spricht für eine unspezifische T-Zell-Akkumulation oder eine polyklonale T-Zell-Aktivierung durch ein Superantigen (30). Klonale T-Zellexpansion oder hochgradig repetitive läsionale TZR in chronischen Psoriasisplaques hingegen sprechen für eine antigenspezifische T-Zell-Antwort (31, 91). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das T-Zell-Infiltrat chronischer psoriatischer Plaques hochgradig repetitive TZR-Rearrangements enthält und durch klonal expandierte T-Zellpopulationen charakterisiert ist (31, 91). Mit Ausnahme zweier früherer Studien (78, 136) fand die Mehrheit der Untersucher bevorzugte T-Zell-Repertoires in erkrankter Haut. Bei der Analyse der läsionalen TZR wurden meist repetitive TZR-Rearrangements detektiert und enthüllten so die Präsenz oligoklonaler T-Zell-Populationen (1, 31, 32, 79, 91, 120, 163), was für eine antigen-spezifische T-Zell-Aktivierung spricht.

Es besteht allerdings eine beträchtliche Inkonsistenz zwischen diesen Untersuchungen hinsichtlich der bei der Expansion involvierten TZR-BV-Familien, jedoch mit bevorzugter Expression von TZR-BV-Regionen wie entweder BV 3, 13S1 oder 17 (31, 32), BV2 (78, 91, 163, 79), BV6 (91, 163) oder BV19 und 22 (18). Bemerkenswert war die Identifikation von identischen TZR-BV-Rearrangements in läsionaler, nicht jedoch in unbefallener Haut oder im peripheren Blut von Psoriatikern auch über einen Zeitraum von mehreren Jahren nach vollständiger Remission (164). Die Abwesenheit der dominanten TZR-Rearrangements in den nicht psoriatisch veränderten Hautpartien weist darauf hin, dass die T-Lymphozyten mit diesen klonalen TZR nicht bloß nur über mehrere Jahre in der Haut persistieren, sondern dass diese bestimmte T-Zell-Rekrutierung und klonale T-Zellexpansion tatsächlich mit der Krankheitsmanifestation in Beziehung steht. Das selektive Auftreten derselben TZR-Rearrangements in den Läsionen könnte demnach eine kausale Assoziation mit der psoriatischen Inflammation besitzen (164). Die Identifizierung konservierter TZR-BV CDR3-Motive innerhalb läsionaler Haut von unterschiedlichen Patienten (122) sowie von identischen TZR-Rearrangements in Läsionen und Synovia von Patienten mit Psoriasisarthritis (153) sind zudem Hinweise darauf, dass einige T-Lymphozyten, die in chronische Psoriasisplaques infiltrieren, auch bei unterschiedlichen Patienten und in unterschiedlichen, von Psoriasis betroffenen Geweben ein bestimmtes Epitop eines gemeinsamen Psoriasisantigens erkennen (122).

Auch in verschiedenen anderen T-Zell-mediierten Erkrankungen wird eine chronische antigen-spezifische T-Zell-Antwort auf dominierende Antigene durch klonale TZR-Rearrangements diskutiert (164). Dieselben dominanten TZR-Rearrangements wurden wiederholt in betroffenen Gelenken bei rheumatoider Arthritis (2) und juveniler rheumatoider Arthritis beobachtet (57). In Hirnläsionen bei multipler Sklerose wurden konservierte TZR-VDJ-Rearrangements homolog zu CDR3-Motiven gegen das myelin basic protein spezifischer T-Zellen nachgewiesen (104, 173). Basierend auf der Analyse von TZR-Rearrangements, konnte beobachtet werden, dass in Hautläsionen von Patienten mit atopischer Dermatitis dieselben allergen-spezifischen T-Zell-Klone über mehrere Jahre enthalten waren (19). Die über längere Zeit persistierenden TZR in der Haut von Psoriasis-Patienten sprechen aus diesem Grunde ebenfalls für eine prädominante und stabile T-Zell-Antwort gegenüber einem bestimmten psoriatischen Antigen. Unabhängig davon, um welches Antigen es sich hierbei handeln könnte, kann Psoriasis demnach als eine antigenspezifische T-Zell-vermittelte Immunreaktion angesehen werden (121). Ob es sich bei diesem Antigen um ein körpereigenes oder fremdes Peptid handelt, ist bisher ungeklärt.

1.3.2 Bedeutung von Superantigenen bei Psoriasis

Einer Psoriasis-Erstmanifestation geht oft eine Infektion mit β -hämolyisierenden Streptokokken voraus (154). Die Assoziation zwischen Psoriasismanifestation und Streptokokken- bzw. Staphylokokkeninfektion (86) wirft mehrere Fragen auf. Die Verbindung zwischen immunkompetenten T-Zellen und deren Aktivierung durch Bakterienantigene wurde mit Hilfe der Beschreibung so genannter „Superantigene“ hergestellt (103). Superantigene sind mikrobielle Toxine, die T-Zellen antigenunabhängig aktivieren. Dabei vernetzen sich die TZR-BV unspezifisch mit MHC-Klasse-II-Molekülen, wodurch die für die T-Zell-Aktivierung notwendigen Signale ausgelöst werden, was zu einer polyklonalen T-Zell-expansion führt (121). Die Annahme, dass Superantigene eine bedeutende Rolle als Trigger der Psoriasis spielen (78, 79, 161), wird durch die oben bereits angeführten Studien in Frage gestellt, da es sich bei den psoriatischen Hautveränderungen vorwiegend um klonale T-Zell-Infiltrate zu handeln scheint.

Die sog. „molekular mimikry“ postuliert alternativ, dass Infektionserreger und körpereigene Proteine Bereiche aufweisen, die in bestimmten Arealen identische Aminosäure-Sequenzen besitzen (3, 116). Dabei kann es zu einer kreuzreagierenden T-Zell-Antwort zwischen Wirt und Pathogen kommen. Strukturhomologien zwischen dem Hauptvirulenzfaktor der Streptokokken, dem M-Protein, und verschiedenen organspezifischen Proteinen, wie z.B.

Basalmembranproteinen, werden hier für die Auslösung einer T-Zell- oder Antikörpervermittelten Autoimmunantwort verantwortlich gemacht (129).

Die Anwesenheit erhöhter Antikeratin-Antikörper im Serum während des aktiven Krankheitsgeschehens (4) deutet darauf hin, dass epidermales Keratin möglicherweise als Autoantigen bei Psoriasis eine Rolle spielen könnte. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass ein Streptokokkeninfekt Psoriasis guttata auslösen kann, Sequenzhomologien zwischen Keratin und dem Streptokokken M-Protein bestehen (47) und dass T-Zellen aus peripherem Blut von Psoriasis-Patienten *in vitro* durch synthetische Peptid-Fragmente des Streptokokken M-Proteins bzw. Keratin 6 oder 17 aktiviert werden konnten (59, 72).

Die Determinierung der Antigenspezifität expandierter Klone aus psoriatischen Plaques wäre mithin von immensem Wert, sowohl für das Verständnis des Krankheitsprozesses als auch für die Entwicklung neuer effektiverer Therapiemöglichkeiten (52).

1.4 Kombinatorische Peptidbibliotheken

1.4.1 Identifizierung unbekannter T-Zell-Epitope

Bisher wurden mehrere Verfahren entwickelt, um unbekannte T-Zell-Epitope zu determinieren (13, 81, 123). Diese Verfahren sind darauf ausgerichtet, natürliche Epitope zu identifizieren. In den meisten Fällen wird dabei zuerst das zum Epitop zugehörige Protein identifiziert. Anschließend können die Sequenzabschnitte, die mit dem T-Zell-Epitop korrespondieren, durch verschiedene Verfahren determiniert werden (60). Alternativ können auch Algorithmen verwendet werden, die für die Epitopbestimmung des jeweiligen Proteins bekannte MHC-Bindungs-Muster verwenden, kombiniert mit einer anschließenden Peptid-Synthese und der Beurteilung ihrer Aktivität in T-Zell-Stimulations-Assays (20).

All diese Methoden sind sehr zeitaufwendig, mühselig in ihrer Durchführbarkeit, kostspielig und benötigen meist eine große Menge biologischen Materials zur Extraktion und Identifikation natürlicher Epitope (60, 114).

Die Verwendung kombinatorischer Peptidbibliotheken durch das sog. Positional Scanning Format (PS-SCL) wurde als eine alternative Methode zur Identifizierung relevanter T-Zell-Epitope entwickelt (114, 130).

1.4.2 Kombinatorische Peptidbibliotheken allgemein

Kombinatorische Peptidbibliotheken repräsentieren eine enorme Vielfalt individueller Peptide (70, 113). Sie vermögen die effektive Anzahl von Peptiden, die gescreent werden könnten, beträchtlich zu erhöhen (114). Anstatt individuelle Peptidanaloga zu testen, können nun Tausende bis Millionen von Peptiden in einem einzigen Assay geprüft werden, um anschließend die Spezifität einer bestimmten Interaktion definieren zu können.

Es existieren verschiedene Varianten von PS-SCL. Diese können sich in der Peptidlänge unterscheiden, oder chemisch modifiziert sein (65). Rubio-Godoy *et al.* demonstrierten, dass die Adäquatheit der PS-SCL-Daten für die Identifizierung eines Peptid-Liganden variiert, abhängig davon, welche PS-SCL verwendet wird.

1.4.2.1 Prinzip der PS-SCL

PS-SCL bestehen aus hochkomplexen Peptidgemischen, die in Sub-Bibliotheken organisiert sind. Jede Verbindung in einem gegebenen Gemisch besitzt eine gemeinsame Aminosäure an einer definierten Position, während die restlichen Positionen aus randomisierten Gemischen aller L-natürlichen Aminosäuren (außer Cystein) bestehen.

Die Sub-Bibliotheken unterscheiden sich nur durch die Lokalisation der definierten Aminosäuren voneinander (20, 63). Das Positional-Scanning-Verfahren erfasst simultan jede Position der Bibliothek. Das Screening einer kombinatorischen Peptidbibliothek bestimmt die aktivsten Aminosäuren an jeder Position des Moleküls. Die Kombinationen der ausgewählten Aminosäuren von jeder Position der kombinatorischen Peptidbibliothek werden dann in einem Folgeversuch synthetisiert und deren stimulatorische Aktivität determiniert. Der Vorteil der PS-SCL besteht darin, dass nur eine einzige Synthese notwendig ist, um eine aktive individuelle Verbindung zu erhalten (114).

Antigene MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe, welche die endogen gebildeten nachahmen, entstehen beim Screening mit kombinatorischen Peptidbibliotheken durch exogene Beladung freier Klasse-I schwerer Ketten an der Zelloberfläche mit synthetischen Peptiden in Präsenz von β 2-Mikroglobulin. Dies ermöglicht den Einsatz löslicher PS-SCL (131). Der wesentliche limitierende Faktor ist bei dieser Methode die Verfügbarkeit einer ausreichenden Anzahl von T-Zell-Linien einer bestimmten Spezifität. Jede analysierte Probe enthält Billionen von Peptiden, die nur eine bestimmte Aminosäure in einer definierten Position gemeinsam haben. Die Konzentration der individuellen Peptide in jedem Gemisch reicht von 10^{-15} bis 10^{-16} Mol. Das Signal, wodurch eine T-Zell-Aktivierung noch wahrgenommen werden kann, wird in den

meisten Assays bereits bei einer Konzentration von 10^{-12} Mol nicht mehr erkannt. Demnach kann ein Antwortsignal nur detektiert werden, wenn simultan zahlreiche Peptide einer bestimmten Sub-Bibliothek erkannt werden.

Die Fähigkeit von T-Zellen, mit einer einzigen TZR-Sequenz multiple Peptide wahrzunehmen, stellt in der Tat ein häufiges Phänomen dar, bekannt als „Degeneration der T-Zell-Erkennung“ (89). Während die Degeneration der T-Zell-Erkennung den Einsatz des PS-SCL-Ansatzes überhaupt erst ermöglicht, impliziert er auch eine Komplexitätsebene, die eine Herausforderung an die Dateninterpretation darstellt. Zusätzlich zu der nativen Aminosäure sind an einer festgelegten Position außerdem Aktivitäten durch alternative Aminosäuren zu erwarten, deren Präsenz an dieser Position sich entweder vorteilhaft auf die Peptidbindung zum MHC-Molekül und/oder auf die T-Zell-Erkennung auswirkt. Obwohl erwartet werden kann, dass die meisten kreuzreagierenden Peptide einer Probe biochemisch konservative Austausch der nativen Aminosäuren darstellen, wurden bereits Ausnahmen für diese Regel beschrieben (65, 76, 115, 170).

1.4.2.2 Screening der PS-SCL

Das Screening der PS-SCL zur Identifizierung $CD4^+$ - bzw. $CD8^+$ -restringierter Peptid-Liganden kann mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden. Das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung für $CD4^+$ T-Zell-Klone kann z.B. durch Proliferations-Assays beurteilt werden, die die Inkorporation von [3H]-Thymidin in neu synthetisierte DNA messen.

Das Maß der $CD8^+$ T-Zell-Aktivierung erhält man entweder durch die Messung der [^{51}Cr]-Freisetzung, Fluoreszenz-basierte Assays, welche die Zytotoxizität messen, oder durch die quantitative Evaluierung von Zytokinproduktion und Freisetzung (z.B. INF-gamma), gemessen durch gebräuchliche „Sandwich“-ELISA (20).

Der von uns eingesetzte BrdU-Assay stellt ebenfalls eine mögliche Methode dar, um die T-Zell-Aktivität von sowohl $CD4^+$ - als auch $CD8^+$ T-Zellen zu bestimmen.

1.4.2.3 Einsatz von PS-SCL

Der Einsatz kombinatorischer Peptidbibliotheken stellte sich als extrem erfolgreich heraus bei der Identifizierung neuartiger biologisch aktiver Agonisten als auch Antagonisten von Opioid-Rezeptoren (36), Inhibitoren mit enzymatischer Aktivität (41,166) und Verbindungen, die eine hohe Affinität zu Antikörpern besitzen (112, 113). Kürzlich wurde dieses Verfahren eingesetzt, um die Degeneration alloreaktiver $CD8^+$ -T-Zellen zu demonstrieren (60, 61) und um Liganden für MHC-Klasse I- und Klasse II-Moleküle (48, 160) zu identifizieren.

Eine Variation der Positional-Scanning-Methode wurde zur Identifizierung von Liganden für tumorspezifische, zytolytische T-Lymphozyten eingesetzt (17). Es konnte hierbei gezeigt werden, dass der Einsatz von PS-SCL eine schnelle Identifizierung von T-Zell-Epitopen bei Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankung und Tumoren erlaubt (20).

Die Verwendung von kombinatorischen Peptidbibliotheken erlaubt insbesondere die Identifizierung von T-Zell-Liganden, die nicht unbedingt mit der Sequenz beschriebener Proteine korrespondieren, z.B. Superagonisten (170) und von solchen, die mit Proteinen korrespondieren, die in der Datenbank präsentiert sind. Die Identifizierung von T-Zell-Liganden, die mit Proteinen korrespondieren, die in Datenbanken präsentiert sind, wurde erreicht durch die Integration von Informationen durch das Screening mit kombinatorischen Peptidbibliotheken und biometrische Analysen.

2 Fragestellung

Obwohl die wichtige Rolle der T-Zellen in der Pathogenese der Psoriasis weitgehend akzeptiert ist, sind wichtige Aspekte der genauen Funktion dieser Zellen im Krankheitsgeschehen noch weitgehend ungeklärt. Trotz der Erkenntnis, dass die intraepidermale T-Zell-Aktivierung eine Schlüsselrolle in der Krankheitspathogenese spielt, ist nach wie vor unbekannt, wodurch diese Aktivierung ausgelöst wird. Um Näheres über den unbekanntes T-Zell-Stimulus zu erfahren, bietet es sich an, die T-Zell-Rezeptor-Spezifität der Lymphozyten in entzündlichen Infiltraten zu analysieren. Die vorliegende Arbeit sollte geeignete Verfahren zur Isolierung, Expansion und Klonierung von T-Zellen aus psoriatischen Plaques etablieren, sowie die Frage klären, ob kombinatorische Peptidbibliotheken dafür geeignet sind, die Spezifität von T-Zellen aus psoriatischen Plaques zu ermitteln.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien/Reagenzien

3.1.1 Verwendete Reagenzien

Die nachfolgende Auflistung enthält die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Reagenzien und deren Hersteller:

AIM-V Medium	500ml	Invitrogen/GIBCO™ (Karlsruhe)
Annexin V-PE	20 Tests	BenderMed System (Wien, Österreich)
Anti-CD 28 Klon YTH 913.12	100 Tests/ml	Biosource (Nivelles, Belgien)
Anti-FasLigand(human) Klon 5G51	0,2mg	Biocheck (Münster)
Anti-FITC-Microbeads	2ml	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Anti- human CD3 (HIT 3 A)	0,2ml	BD- Pharmingen (Heidelberg)
Anti- human CD8-PE	0,5ml	CALTAG (Hamburg)
Anti-CD95-Ligand		BenderMed System (Wien, Österreich)
BrdU Flow Kit		BD-Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO	1mg	Calbiochem® (Schwalbach, Deutschland)
CD25-FITC, anti-human	1ml	Dako Cytomation (Hamburg, Deutschland)
CD4-PerCp		BD- Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Concavalin A		SIGMA-Aldrich (Deisenhofen)
FastImmune Anti BrdU with DNase	50 Tests	BD- Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Fetal bovine Serum	500ml	Invitrogen/ GIBCO™ (Karlsruhe)
Ficoll Paque™ Plus	500ml	Amersham Biosciences (Freiburg)
Humanserum converted	100ml	PanBiotec (Aidenbach, Deutschland)
Interleukin-2 (Proleukin® S)		Chiron Corporation (CA,USA)
Interleukin-7-human	10µg	Peptotech, TEBU (London, UK)
Interleukin-15-human	10µg	Peptotech, TEBU (London, UK)
MnTBAP		Biomol (Hamburg, Germany)
PBS Duplecco's	500ml	GIBCOInvitrogen Corporation (Karlsruhe)
PHA-L	5mg	Novagen (Schwalbach, Deutschland)
Peptidbibliotheken PCL 99-1(Deka-Peptide-Library) PCL 97-3(Nona-Peptide-Library) TPI 921(Nona-Peptide-Library,carboxyfree)		Torrey Pines Institute (CA, USA)

3.1.2 Zusammensetzungen häufig verwendeter Reagenzien:

DMSO-Medium	hitzeinaktiviertes und filtriertes FCS
	10% DMSO
AIMV+-Medium	90% AIM-V
	5% hitzeinaktiviertes und filtriertes FCS
	5% hitzeinaktiviertes Humanserum
	1,75 microl Mercapto-Ethanol

100er-Medium	AIM-V+-Medium
	100 units/ml IL-2
40er-Medium	AIM-V+-Medium
	40 units/ml IL-2
heterologes Humanserum	gepoolte Patientenseren, hitzeinaktiviert
TZL-Medium	40 units/ml IL-2
	100mg/ml IL-7
	10ng/ml IL-15
	95% AIM-V
	5% gepooltes heterologes Humanserum
FACS-Puffer	500 ml PBS
	0,05%iges Na-Azid
	0,1%iges BSA
	5mM Na-EDTA
Klonierungsmedium	2,5ml autologes Serum
	47,5 ml AIM-V
	100 units/ml IL-2
Stimulationsmedium	4ml AIM-V
	40 units/ml IL-2
	1 ng/ml IL-15

3.1.3 Verbrauchsmaterialien und verwendete Geräte

Vortex	Scientific Industries (NY,USA)
FACS-Calibur	Becton Dickinson Labware (Heidelberg, Deutschland)
sterile Abzugshaube Hera safe	Heraeus Instruments (Berlin)
Zentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann (München)
Zentrifuge GS-6	Beckmann (München)
Inkubator IG 150	Cotech(Berlin)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss(Jena)
Microtest Zellkultur-Platten 96-well, U-Bottom	Becton Dickinson Labware (Heidelberg)
Microtest Zellkultur-Platten 96-well, Flat Bottom	Becton Dickinson Labware (Heidelberg)
24-well-Plastic Cell Culture Plates	Becton Dickinson Labware (Heidelberg)
48-well Plastic Cell Culture Plates	Becton Dickinson Labware (Heidelberg)
Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
FACS-Röhrchen (Polystyrol mit Rundboden)	Becton Dickinson Labware (Heidelberg)
Mini MACS-Separation-Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Gewebekultur Petrischale	Becton Dickinson Labware (Heidelberg)

3.2 Methoden

3.2.1 Hautbiopsien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hautbiopsien stammen von Patienten mit klinisch manifester Psoriasis vulgaris oder guttata ohne externe Therapie mindestens 2 Wochen vor der Probenentnahme und ohne systemische Psoriasis-Therapie mindestens 8 Wochen vor der Probenentnahme. Anhand des PASI-Scores werden die psoriatischen Effloreszenzen zum Zeitpunkt der Entnahme festgehalten. Die Biopsien werden steril aus inflammatorischen Plaques entnommen und anschließend noch am selben Tag weiter aufbereitet. Alle Patienten gaben vor der Biopsie und der Blutentnahme (s.u.) ihr Einverständnis mittels einer von der Charité-Ethikkommission genehmigten Patienteninformation und -aufklärung.

3.2.2 Isolierung von autologem Serum und PBMC

Jedem Patienten wurden 50 ml heparinisiertes Venenblut entnommen. Nachdem man zwei 50 ml Röhrchen mit je 18 ml 37°C warmen Ficoll auffüllt, überschichtet man vorsichtig das entnommene Blut und zentrifugiert es 15 Minuten bei 2200 Umdrehungen / Minute ohne Bremse. Nach der Zentrifugation sind insgesamt vier Schichten zu erkennen: Die oberste Schicht stellt das Serum dar. Zwischen Serum und Ficoll befinden sich die PBMC (der sog. „buffy coat“). Darunter folgt das Ficoll und schließlich am Boden Erythrozyten, Granulozyten, sowie Thrombozyten. Das Serum wird nun abgenommen, 45 Minuten bei 55°C hitze-inaktiviert und anschließend bei 3000 Umdrehungen/Minute 15 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Den Überstand (autologes Serum) bewahrt man bei -20°C auf. Der buffy coat wird ebenfalls vorsichtig abpipettiert und mit PBS ausverdünnt, bei 1500 Umdrehungen/Minute 5 Minuten zentrifugiert und anschließend 5-6 mal gewaschen, um die PBMC möglichst von den Erythrozyten und Thrombozyten zu reinigen. Daraufhin werden die PBMC mit der Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt, mit 30 Gray bestrahlt und in Kryoröhrchen, welche je 1 ml Einfrier-Medium enthalten, nach folgendem Schema gefroren: eine Stunde auf Eis, anschließend 24 Stunden bei -80°C und dann bei -140°C gelagert.

3.2.3 Aufbereitung der Hautbiopsien

In einer sterilen Petrischale befindet sich auf 37°C angewärmtes PBS. In diese wird die von den Patienten entnommene Hautspindel gegeben und anschließend mittels eines Skalpells und einer Pinzette so klein wie möglich geschnitten. Dabei wird versucht, die Haut so weit wie möglich von Erythrozyten zu reinigen. Die zerkleinerte Haut wird dann auf 3-4 Wells einer 24-well-Platte verteilt, in denen sich je 2 ml AIMV+-Medium mit 100 units/ml IL-2 befinden. Die Platte wird dann für eine Woche in den Inkubator gestellt und das Medium alle 2-3 Tage ausgewechselt.

3.2.4 Klonierung von CD25⁺ Zellen aus psoriatischer Haut

3.2.4.1 Identifizierung der ausgewanderten Zellen

Der gesamte Versuch wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nachdem die Platte mit der Hautbiopsie und dem Medium eine Woche inkubiert wurde, wird das Medium von der Haut abgenommen und bei 1500 Umdrehungen/Minute 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 250 µl AIMV+-Medium mit 100 units/ml IL-2 aufgenommen und resuspendiert. 25 µl werden davon zur FACS Analyse abgenommen, die restlichen 225 µl auf Eis gelagert. Die zur FACS-Analyse verwendeten Zellen werden mit einem Antikörper-Cocktail (CD3-APC, CD4-PerCp, CD8-PE und CD25-FITC) 10 Minuten im Dunkeln inkubiert, in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen und bei 1500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und im FACS-Calibur gemessen.

3.2.4.2 Markierung von CD25⁺ Zellen

Stellt sich bei der FACS-Analyse heraus, dass eine genügende Anzahl der Zellen aktiviert ist, d.h. CD 25⁺ ist, werden die restlichen Zellen für die Sortierung (s. nächster Abschnitt) mit 22,5µl anti-CD25-FITC markiert, resuspendiert und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension auf 2 ml aufgefüllt, zentrifugiert und das Pellet in 80µl Medium aufgenommen. Mit der Pipettenschraube wird nun noch mal das genaue Volumen bestimmt und pro 80 µl Medium 20 µl anti-FITC-micro-beads hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C werden 2 ml Medium dazugegeben, zentrifugiert und die Zellen in 500 µl Medium resuspendiert.

3.2.4.3 Zellsortierung

Um aus den heterogenen Zellpopulationen T-Zell-Klone zu erhalten, erstellten wir als nächstes ein Protokoll zur T-Zellsortierung. Dabei werden, um eine effiziente Klonierung zu gewährleisten, die T-Zellen zuvor sortiert, um einen möglichst hohen Anteil an CD25⁺T-Zellen zu erhalten. Hierfür bietet sich das MACS-System an, das eine schonende Methode der Zellsortierung darstellt und auf Magnetismus beruht, indem Zellen mit magnetischen micro-beads markiert werden. Die anti-FITC-micro-beads sind kleinste Magnetkügelchen, die an anti-CD25-FITC binden, wodurch man mit Hilfe einer Magnetsäule die CD25⁺ Zellen isolieren kann, da nur die CD25⁺ Lymphozyten (s.o.), mit anti-FITC-micro-beads markiert werden und in der Magnetsäule hängen bleiben, wohingegen die unmarkierten CD25⁻ Lymphozyten ungehindert die Magnetsäule passieren können.

3.2.4.3.1 Sortierung der CD25⁻ Zellen

Eine Mini-MACS-Separation Säule wird zunächst in den Magneten plaziert und mit 500 µl Medium äquilibriert. Die 500 µl Zellsuspension wird von oben in die Magnetsäule pipettiert. Der Durchlauf wird als "NEGATIV" Fraktion in einer 15ml-tube gesammelt. Nun wird ein Dreiwegehahn steril an die Magnetsäule gesteckt und zum Waschen mit einer Spritze 1500 µl 100er-Medium so von unten nach oben gedrückt, dass die Flußrate in etwa der Schwerkraftgetriebenen Flußrate der vorangegangenen Adsorption entspricht (retrograder Waschschrift). Der solcherart oberhalb der Säule sich sammelnde Überstand wird ebenfalls in die Negativ-Fraktion überführt. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt. Zuletzt wäscht man von oben 1 ml Medium durch die Magnetsäule, wartet bis alles in die 15ml-tube gelaufen ist (anterograder Waschschrift) und entnimmt 300 µl für die FACS Analyse. Die Zellsuspension, die nun nur noch CD25⁻ T-Lymphozyten enthalten sollte, wird zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit einer Spritze abgenommen und das verbleibende Volumen bestimmt, welches ca. 100 µl betragen sollte. 10µl werden zum Zählen abgenommen und der Rest auf Eis gelagert.

3.2.4.3.2 Sortierung der CD25⁺ Zellen

Die zuvor mit den anti-FITC micro-beads markierten CD25⁺ Zellen befinden sich nach den o.g. Waschsritten noch in der Magnetsäule. Aus diesem Grund, werden nun mit einer Spritze, die an den Dreiwegehahn gesteckt wird, 200 µl 100er-Medium mit Druck kurz und schnell von unten durch die Magnetsäule geschossen (retrograde Elution). Die 200 µl werden oben abgenommen und nun in das, mit POSTIV-FRAKTION gekennzeichnete, 15ml-tube pipettiert.

Daraufhin wird die Magnetsäule aus dem Magneten genommen, noch mal 1ml 100er-Medium oben hinein pipettiert und mit zu Hilfenahme eines Stempels mit Druck von oben durch die Säule in die POSITIV-FRAKTION geschossen (anterograde Elution). 100 µl werden zum FACSen abgenommen, der Rest ebenfalls zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Volumen bestimmt, gezählt und auf Eis gelagert.

3.2.4.4 FACS-Analyse

Um die Effizienz der Sortierung beurteilen zu können, werden die Zellen ge-FACSt. Dafür werden die Zellen mit CD3-APC, CD8-PE, CD25-FITC und Propium-Iodid gefärbt. Der Prozentanteil der CD3-positiven Zellen von allen in Lösung befindlichen Zellen wird dann errechnet.

3.2.4.5 Klonierung der T-Lymphozyten durch sog. „limited-dilution“

3.2.4.5.1 Ausplattierung der T-Lymphozyten

Die Zellen in der POSITIV-Fraktion werden in der Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt und die genaue Anzahl der CD3⁺ Zellen mit Hilfe der FACS-Analyse berechnet. Man plattiert die Zellen auf insgesamt 384 wells aus. Dafür verwendet man vier 96-well U-Bottom-Platten (Rundboden-Platten). Die Hälfte der Platten wird statistisch gesehen mit je 1 Zelle/well ausplattiert. Die andere Hälfte wird mit weniger Zellen ausplattiert (statistisch 0,3 Zellen/well), um eine möglichst hohe Wahrscheinlichkeit zu gewährleisten, dass sich tatsächlich nur ein Klon in einem well befindet (s. Abbildung 1). In jedes well werden 10 µl Klonierungsmedium gegeben, in welchem die Zellen vorher gelöst wurden.

3.2.4.5.2 Ausplattierung der peptid-gepulsten PBMC

Pro well werden 5×10^4 bestrahlte PBMC als Stimulator- und „feeder“-Zellen benötigt, bei insgesamt ca. 400 wells beträgt die Anzahl der verwendeten PBMC pro Experiment demnach 2×10^7 . Nachdem die PBMC aufgetaut und zentrifugiert wurden, wird das Pellet in insgesamt 6 ml Klonierungsmedium aufgenommen und auf vier Eppendorfgläser aufgeteilt, so dass sich in jedem nun ein Volumen von 1,5 ml befindet. Jetzt werden die PBMC mit Peptiden gepulst. Dadurch soll die Klonierungseffizienz verbessert werden. Getestet werden Peptide, die aus 9 bzw. 19 Aminosäureketten mit zufälliger Anordnung bestehen, sowie Glycin, bzw. Lysinresten an den C-terminalen Enden besitzen, um später feststellen zu können, durch welche die Zellen am besten zur Proliferation stimuliert wurden. Verwendet werden X19-, XgGK- und XgGKK-

Peptidbanken. Diese werden jeweils zu 25 µl zu den 1,5 ml hinzugegeben (in ein Eppendorfgefäß nur 25 µl 100er-Medium als Negativkontrolle), 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder auf je zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt, so daß man insgesamt acht Eppendorfgefäße mit dem jeweiligen Peptid und PBMC besitzt, die nun auf die acht unterschiedlichen Bedingungen (s.unten) verteilt werden können. In jedes well werden 15 µl peptidgepulste PBMC pipettiert und über Nacht in den Zellinkubator gestellt. Am nächsten Tag gibt man nun auf die insgesamt 25µl/well zusätzlich jeweils 150 µl, wickelt die Platten in Aluminium-Folie zur Minimierung der Evaporation und wartet mindestens eine Woche, bis man die Anzahl der proliferierten Klone bestimmt. Sind nach drei Wochen keine Klone gewachsen, verwirft man die Platten. Veranschaulichend ist die Verteilung der unterschiedlichen Bedingungen auf die vier Mikrotiterplatten nachfolgend nochmal schematisch dargestellt:

0,3 Zellen/well												1 Zelle/well													
1.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	3.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													A												
B													B												
C													C												
D													D												
E													E												
F													F												
G													G												
H													H												
	X19						X9GK							X19						X9GK					
2.													4.												
A													A												
B													B												
C													C												
D													D												
E													E												
F													F												
G													G												
H													H												
	X9GKK						Negativkontrolle							X9GKK						Negativkontrolle					

Abbildung 1: Schema der Ausplattierung von T-Lymphozyten mit peptidgepulsten PBMC, mit jeweils drei unterschiedlichen Peptidbanken und jeweils einer Negativkontrolle zur T-Zell-Klonierung.

Die CD25⁻ Zellen werden in 1ml Einfriermedium eine Stunde auf Eis gelagert, anschließend 24 Stunden bei -80°C und dann bei -140°C gefroren.

Die verbleibenden T Zellen, die nicht ausplattiert worden sind, werden ebenfalls mit Peptiden gepuffert, in ein Rundboden-well einer 96-well-Platte gegeben in den Inkubator gestellt und als polyklonale Zellkultur propagiert.

3.2.4.6 Expansion der T-Zell-Klone

Zweimal pro Woche werden die Lymphozyten mit Stimulationsmedium versorgt. Erkennt man unter dem Mikroskop, dass ein Klon stark proliferiert ist, setzt man ihn zunächst auf zwei 96- U-

well, anschließend auf ein 96-Flachboden-well um. Ist diese well konfluierend, d.h. es liegt eine hohe Klondichte vor, so wird der Klon gezählt und mit AnnexinV-PE, CD25-FITC, CD4-PerCp und CD3-APC ge-FACSt. Wenn drei 96-Flachboden wells eines Klones konfluent sind, werden die Klone auf eine 24-well-Platte übertragen bzw. vereinigt und weggefroren. Ähnlich geht man mit den polyklonalen Zellen vor. Diese werden jedoch erst ge-FACSt, wenn eine 24-well-Platte voll ist, gezählt und ab einer Anzahl von etwa 10^6 Zellen weggefroren. Die polyklonalen Zellen können auch zur nochmaligen Klonierung verwendet werden.

3.2.5 Klonierung drei Tage nach Sortierung

Zunächst wird wie unter Punkt 3.2.4.1.-3.2.4.4. beschrieben vorgegangen. Die CD 25⁺ Zellen werden nun jedoch in einem 96-U-well zusammengefasst und zwei Tage lang in 25 µl AIMV-Medium (5% autologes Plasma, 40 units/ml IL-2 und 1ng/ml IL-15) inkubiert, um nach der MACS-Sortierung eine Regenerationsphase vor der nachfolgenden Ausverdünnung einzubauen. Am dritten Tag nach der Sortierung werden die Zellen ausplattiert. Man bereitet hierzu als erstes das Medium vor. Dieses besteht aus je 16 ml AIM-V, 5% (v/v) autologem Plasma, 40 units/ml IL-2 und 1ng/ml IL-15. Insgesamt werden vier Bedingungen getestet: 0,1µg/ml anti-CD3 (der stimulierende Klon HIT 3A); 0,1 µg/ml anti-CD3 + 1 ng/ml anti-CD28; 1 ng/ml PHA, sowie eine Negativkontrolle. Die Verteilung der unterschiedlichen Bedingungen auf die vier Mikrotiterplatten ist nachfolgend nocheinmal schematisch dargestellt:

1 Zelle/well

1.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	3.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													A												
B													B												
C													C												
D													D												
E													E												
F													F												
G													G												
H													H												
anti-CD3(0,1µg/ml)												PHA(1µg/ml)													
2.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	4.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													A												
B													B												
C													C												
D													D												
E													E												
F													F												
G													G												
H													H												
anti- CD-3(0,1µg/ml)+anti-CD28(1ng/ml)												Negativkontrolle													

Abbildung 2: Schema der Ausplattierung von Lymphozyten drei Tage nach MACS-Sortierung unter insgesamt vier verschiedenen Bedingungen mit rein statistisch gesehen je einer Zelle/well.

Für die „limiting dilution“ werden die T-Zellen, die zwei Tage in Medium gehalten wurden, gezählt, dann in PBS und 5mM EDTA gewaschen und 1 Zelle/well ausplattiert. In jedes well gibt man außerdem 3×10^4 PBMC. Ist nach maximal drei Wochen ein Klon stark proliferiert, bestimmt man dessen Zellzahl. Beträgt diese $\geq 10^5$ /well, werden 10% der Zellen abgenommen, mit CD3-APC, CD4-Per-Cp, CD8-PE und Annexin ge-FACSt und die restlichen 90% auf 96-well U-bottom-plates ausplattiert.

Die nun getesteten Bedingungen sind folgende: Jeweils 2×10^3 klonale T-Zellen und 3×10^4 PBMC pro well plus PHA, PHA und anti-CD95-Ligand, PHA und DEVD-CHO, anti-CD3, anti-CD3 und anti-CD95-Ligand, anti-CD3 und DEVD-CHO, anti-CD3 und anti-CD28, anti-CD3 und anti-CD28 und anti-CD95-Ligand, anti-CD3 und anti-CD28 und DEVD-CHO, sowie eine Negativkontrolle. Zur Verdeutlichung ist dies nachfolgend in Abbildung 3 dargestellt:

Negativkontrolle	PHA (1µg/ml)	anti-CD3 (0,1µg/ml)	anti-CD3 (0,1µg/ml) anti-CD28 (1µg/ml)
Kein Apoptosehemmer			
anti-CD95-Ligand			
DEVD-CHO			

Abbildung 3: Monoklonale T-Zellen mit PBMC entweder mit oder ohne einem Apoptoseinhibitor in Kombination mit stimulatorischen PHA, anti-CD3 oder anti-CD28.

Nach einer Woche werden die Zellen mit den jeweiligen Reagenzien restimuliert, gezählt und wieder ge-FACSt. Als Antikörper verwendet man CD 3-APC, CD4-PerCp, CD25-FITC und Annexin. Stellt sich beim Zählen der Zellen heraus, das die Zellzahl $\geq 10^4$ pro well ist, splittet man die wells im Verhältnis 1:2 auf. Nach einer weiteren Woche werden die klonalen Lymphozyten ein weiteres Mal gezählt, wie oben beschrieben ge-FACSt und gegebenenfalls auf 48-well Platten übertragen.

3.2.6 Klonierung von polyklonalen Zellen

Die Zellen, die nicht zur Klonierung verwendet wurden, werden ebenfalls ausplattiert und wie in Abbildung 4 dargestellt unter den verschiedenen Bedingungen getestet. Anschließend wird mit ihnen, wie mit den klonalen T-Zellen in (s.o. 3.2.5) verfahren. Nach drei-wöchiger Testung mit den genannten Reagenzien nahmen wir ein weiteres Reagenz (MnTBAP) in einer Konzentration von 50µM mit in die Versuchsreihe auf.

	PHA (1µg/ml)	anti- CD3 (0,5µg/ml)	anti-CD3 (0,5µg/ml) anti-CD28(1µg/ml)
Negativkontrolle			
anti-CD95-Ligand			
DEVVD-CHO			
MnTBAP			

Abbildung 4: Polyklonale T-Zellen mit PBMC entweder mit oder ohne einem Apoptoseinhibitor in Kombination mit stimulatorischen PHA, anti-CD3 oder anti-CD28.

Das Ziel der Klonierung war, herauszufinden, unter welchen Bedingungen die Klone am besten proliferieren, was sich als eine sehr schwierigere Aufgabe herausstellte. Aus diesem Grunde mußte die genaue Handhabung der Klonexpansion z.T. flexibel gehandhabt werden, da die Ausbeute der Klonierung oft nicht der Zellzahl entsprach, die für die Testung mit den Apoptosehemmern benötigt wurde. Daraus ergab sich, dass wir nur die Bedingungen testeten, von denen wir ausgehen konnten, dass sie dazu in der Lage waren, die Zellen am effektivsten zu einer Proliferation zu stimulieren. Als sich etwa nach einem halben Jahr herausstellte, dass die für den Versuch mit den Peptidbibliotheken benötigte Zellzahl von 10^7 pro Klon nicht generiert werden konnte, wurden alternativ polyklonale T-Zell-Linien, wie nachfolgend beschrieben, expandiert.

3.2.7 Expansion polyklonaler T-Zell-Linien

Die Aufbereitung der Hautbiopsie erfolgt wie unter Punkt 3.2.2. beschrieben. Aufgenommen wird die Haut jedoch in TZL-Medium. Die Zellen wandern drei Tage aus der Haut aus. Anschließend wird das Medium von der Haut abgenommen, zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl TZL-Medium aufgenommen. Diese 200 µl Zellsuspension wird in ein well einer 96-well U-bottom-Platte pipettiert und zusätzlich mit 1 µg/ml PHA stimuliert. Alle zwei Tage wird das Medium gewechselt und einmal pro Woche mit 1 µg/ml PHA restimuliert. Die Expansion der polyklonalen T-Zellen wird engmaschig unter dem Mikroskop kontrolliert und dabei darauf geachtet, dass die Zellen subkonfluent sind. Bei Konfluenz teilt man die Zellen folgendermaßen: Sind zwei 96-well U-bottom-plates voll, werden sie auf ein 96-Flachboden-well zusammengeführt. Ist dieses konfluent, wird es 1:2 gesplittet, bis 4 Flachboden-wells konfluent sind. Diese werden auf ein 48-well-Platte vereinigt, bis von diesen ebenfalls vier konfluent sind, welche dann wiederum auf ein 24-well Platten well vereinigt werden. Die Zellen werden dann

bei Konfluenz im Verhältnis 1:2 gesplittet, bis die Zellzahl schließlich mindestens 10^7 beträgt oder die Zellen sich nicht mehr vermehren. Erst dann werden sie in DMSO-Medium weggefroren.

3.2.8 BrdU-Assay

Dieser Assay misst die intrazelluläre Inkorporation von Bromdesoxyuridin (BrdU) in Zellen, die sich in der S-Phase befinden und somit die G₀-Phase verlassen haben. Anschließend wird die Proliferation durch eine FACS-Analyse bestimmt. Es handelt sich um ein Experiment, welches an drei Versuchstagen durchgeführt wird:

1. Tag

Folgende Reagenzien bzw. Zellen werden am ersten Tag verwendet:

- PHA-L
- Peptidbibliotheken (4. und 5. Position)
- TZL-Medium
- $2,5 \times 10^4$ polyklonale T-Lymphozyten pro well

Versuchsaufbau :

Spalte 1 A-F = 6 wells als Negativkontrolle (PBMC + TZL)

Spalte 2 u. Spalte 1 G u. H = 10 wells als Positivkontrolle (PHA, PBMC, TZL)

Spalte 3-7 = 40 wells mit Peptidbibliotheken (Peptidbibliotheken, PBMC, TZL)

Spalte 8-12 = 40 wells mit Peptidbibliotheken als Duplikat

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		10	A ₄	K ₄	T ₄	F ₅	P ₅	A ₄	K ₄	T ₄	F ₅	P ₅
B		3	C ₄	L ₄	V ₄	G ₅	Q ₅	C ₄	L ₄	V ₄	G ₅	Q ₅
C		1	D ₄	M ₄	W ₄	H ₅	R ₅	D ₄	M ₄	W ₄	H ₅	R ₅
D		0,3	E ₄	N ₄	Y ₄	I ₅	S ₅	E ₄	N ₄	Y ₄	I ₅	S ₅
E		0,1	F ₄	P ₄	A ₅	K ₅	T ₅	F ₄	P ₄	A ₅	K ₅	T ₅
F		10	G ₄	Q ₄	C ₅	L ₅	V ₅	G ₄	Q ₄	C ₅	L ₅	V ₅
G	0,3	3	H ₄	R ₄	D ₅	M ₅	W ₅	H ₄	R ₄	D ₅	M ₅	W ₅
H	0,1	1	I ₄	S ₄	E ₅	N ₅	Y ₅	I ₄	S ₄	E ₅	N ₅	Y ₅
Negativ -und Positivkontrolle			Peptidbibliothek +TZL +PBMC					Peptidbibliothek +TZL +PBMC (Kontrolle)				

In diesem Versuch werden eine Deca-Peptid-Bibliothek (PCL 99-1) und zwei Nona-Peptid-Bibliotheken (PCL 97-3 und TPI-921) eingesetzt. Zwanzig Aminosäuren, die jeweils auf der vierten oder fünften Position eines Deca- bzw. Nona- Peptides festgelegt sind, werden auf ihre Affinität zu den Rezeptoren der T-Zellen hin getestet. Der Einsatz der Peptidbibliotheken erfolgt nach folgendem Prinzip: Jedes well testet eine bestimmte Peptidsequenz, wobei eine bekannte Aminosäure auf der vierten oder fünften Position definiert ist und die anderen neun, bzw. acht Aminosäuren randomisiert sind. Die Peptide werden in einem Volumen von 20 µl zu den TZL

und PBMC in die jeweils vorgesehenen wells gegeben. Es werden immer Duplikate angefertigt. Dies gilt ebenfalls für die Positiv -und Negativkontrollen. Die polyklonalen T-Lymphozyten werden entweder einen Tag vorher (sofern sie sie bei -140°C weggefroren waren) aufgetaut, über Nacht inkubiert um dann am folgenden Tag ausplattiert, oder direkt am Versuchstag aus der polyklonalen T-Zellkultur entnommen. $2,5 \times 10^4$ /well polyklonale T-Lymphozyten werden pro Versuch in TZL-Medium aufgenommen und zu je $100 \mu\text{l}$ in jedes well einer 96-well Flachbodenplatte pipettiert. Nach dem Auftauen werden die autologen PBMC mit 30 Gy bestrahlt. Benötigt werden insgesamt 10^5 /well. Diese werden in TZL-Medium aufgenommen und zu je $80 \mu\text{l}$ /well ausplattiert. Als Positivkontrolle verwendet man PHA-L in finalen Konzentrationen von $0,1 - 10 \mu\text{g/ml}$ pro well. Nach dieser Versuchsdurchführung, werden die Zellen mit den Peptidbibliotheken 48 Stunden inkubiert.

3. Tag

Folgende Reagenzien werden verwendet: BrdU-Lösung, PBS. Ein Aliquot mit BrdU-Lösung wird aufgetaut, das benötigte Volumen entnommen und im Verhältnis 1:31 mit PBS verdünnt. Davon werden jeweils $2\mu\text{l}$ /well zu den Peptidbibliotheken mit den TZL und PBMC zugegeben. Die Zellen werden weitere 24 Stunden inkubiert.

4. Tag

verwendete Reagenzien:

- | | | |
|-------------|---------------|------------------------|
| - anti-BrdU | - CD8-PE | - Cytoperm Plus buffer |
| - CD3-APC | - DNase | - Perm/Wash |
| - CD4-PerCp | - FACS-Puffer | - Cytofix/Cytoperm |

Nach insgesamt 72 Stunden Inkubation werden die Zellen auf eine 96-well Rundbodenplatte übertragen, auf der Platte zentrifugiert und anschließend mit CD3-APC, CD4-PerCp und CD8-PE in einem Verhältnis (Antikörper zu Medium) von 1:25 für die spätere FACS-Analyse gefärbt. Dabei werden in jedes well $20 \mu\text{l}$ Antikörperlösung gegeben, diese für 15 Minuten auf Eis inkubiert und im nächsten Schritt wieder abzentrifugiert. Um eine bessere Penetration von anti-BrdU in die Zelle zu gewährleisten, wird mit Hilfe von Cytofix/Cytoperm die Zellwand permeabilisiert, indem die Zellen mit jeweils $70\mu\text{l}$ /well Cytofix/Cytoperm (gebrauchsfertig) behandelt werden. Nach 20-minütiger Einwirkzeit wird wieder abzentrifugiert und anschließend $25\mu\text{l}$ /well Cytoperm Plus buffer (ebenfalls gebrauchsfertig) in die einzelnen wells pipettiert. Nachdem 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend wieder abzentrifugiert wurde, werden die Zellen noch ein weiteres Mal mit $25 \mu\text{l}$ Cytofix inkubiert. Anschließend erfolgt die FACS-Analyse auf dem FACS-Calibur.

4 Resultate

Insgesamt wurden von 27 Patienten Hautbiopsien in Form von 6 mm Stanzbiopsien entnommen. Bei 14 der 27 Patienten konnte eine Klonierung von T-Zellen (s.u.) durchgeführt werden. Die übrigen 13 Proben zeigten unter dem Mikroskop keine Emigration von T-Lymphozyten aus der entnommenen Haut, so dass angenommen werden muss, dass die Anzahl der aktivierten T-Zellen zu gering war, um eine CD25-basierte Zell-Sortierung mit anschließender Klonierung durchführen zu können. Bei 11 der 14 Patienten konnten T-Zell-Klone etabliert werden.

4.1 Effekte von *in vitro* Kultivierung auf die Phänotyp-Verteilung von T-Zell-Linien

Humane T-Zell-Linien sind *in vitro* leichter zu expandieren als Klone und repräsentieren aus diesem Grund eine attraktive Quelle für T-Zell-Klone, wenn sie für die Krankheits-Pathogenese als relevant erachtet werden. Um einschätzen zu können, ob die phänotypische Verteilung von T-Zellen nach längerer *in vitro*-Proliferation stabil bleibt, verglichen wir die phänotypische Verteilung von T-Zellen sieben Tage nach der Emigration aus psoriatischen Haut-Biopsien mit TZL, die über mehrere Wochen expandiert worden waren (Abbildung. 5).

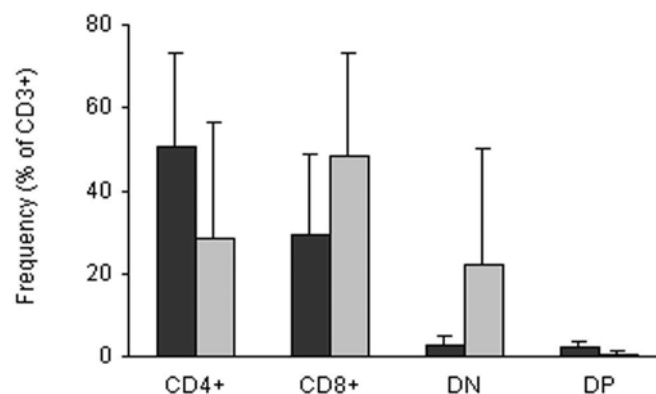


Abbildung 5: Phänotyp-Verteilung, von aus psoriatischen Plaques emigrierten T-Zellen. Schwarze Balken: FACS-Analyse von CD3⁺ Zellen, emigriert aus psoriatischen Plaques, sieben Tage nach *in vitro*-Kultivierung; graue Balken: TZL expandiert aus Plaques nach einem Median von 34 Tagen (Bereich: 21-85) in Kultur. DP= CD4/CD8 doppelt positiv; DN= doppelt negativ. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwert ± Standardabweichung für T-Zellen von vierzehn (emigrierte Zellen), beziehungsweise zehn (expandierte Zellen) individuellen Patienten.

Zwei hauptsächliche Unterschiede ließen sich dabei beobachten. Erstens konnte man eine Umkehr der CD4⁺/CD8⁺-Ratio feststellen. T-Zellen, die nach nur einer Woche aus psoriatischen

Plaques emigriert waren, enthielten nahezu doppelt so viele CD4⁺T-Zellen im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen. Zweitens zeigte sich eine beträchtliche Akkumulation von CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (doppelt negative, DN) T-Zellen ausschließlich in den über längere Zeit expandierten TZL. Diese Daten lassen erkennen, dass die Klonierung von T-Zellen aus vorher expandierten TZL zu einer Population von T-Zell-Klonen führen kann, die eine unnatürliche phänotypische Verteilung repräsentiert. Daraus ergibt sich, dass die Zellen nur so kurz wie möglich vor Klonierung in Kultur gehalten werden sollten, da man die Zellen später möglichst unverändert für die Versuche mit den kombinatorischen Peptidbibliotheken einsetzen möchte. Das Ziel dabei ist es, eine repräsentative Aussage über die ursprüngliche Population von T-Lymphozyten in den psoriatischen Plaques treffen zu können.

4.2 Beziehung zwischen Krankheitsstatus und T-Zell Phänotyp-Verteilung

Als nächsten Schritt charakterisierten wir die Verteilung der T-Zell-Sub-Populationen von Zellen, die aus psoriatischen Plaques emigriert waren. Die klinischen Merkmale der Patienten, von denen eine Biopsie entnommen wurde, und die phänotypische Verteilung der T-Zellen, die aus den psoriatischen Plaques emigriert sind, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1*

Patient	Klinische Merkmale			T Zell Phänotyp-Verteilung (%)			
	PASI	Alter bei Krankheitsausbruch	Erkrankte Verwandte	CD4+	CD8+	DP+	DN+
1	10,5	73	-	57	18	0,7	8,5
2	17,1	49	-	56	28	2	8,2
3	30,0	45	-	23	44	n.d.	20
4	14,4	37	-	68	14	0,8	68
5	6,5	30	-	69	0,3	4,6	26
6	25,0	28	-	50	42	n.d.	n.d.
7	34,3	23	-	31	62	n.d.	5,6
8	11,9	20	-	78	12	n.d.	8,3
9	16,2	55	+	74	12	1,2	12,7
10	24,7	41	+	36	26	n.d.	11,8
11	27,2	32	+	66	24	3,3	6
12	20,8	22	+	3	63	4	3
13	11,4	22	+	60,6	31,5	2,2	5,6
14	6,2	16	+	60	13	1,6	25

* klinische Merkmale der Patienten, von denen eine Biopsie entnommen wurde, sowie phänotypische Verteilung der aus den psoriatischen Plaques emigrierten T-Zellen.

DP = CD4⁺CD8⁺; DN = CD4⁻CD8⁻

Der Mittelwert der Häufigkeitsverteilung $CD3^+CD25^+$ T-Zellen betrug 46.1 ± 21.3 %. Es fand sich eine Korrelation zwischen dem PASI-Index und der $CD3^+CD25^+$ T-Zell-Population (Abbildg. 6a, $r = 0.62$) und bemerkenswerterweise eine noch stärkere Korrelation zwischen PASI-Index und der $CD8^+CD25^+$ Population (Abbildg. 6b, $r = 0.76$), trotz der insgesamt höheren Frequenz $CD4^+$ T-Zellen (Abbildg.1).

Abbildung 6a:

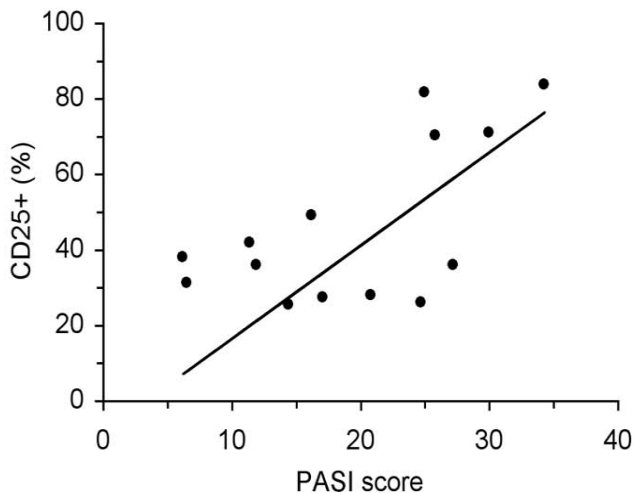


Abbildung 6b:

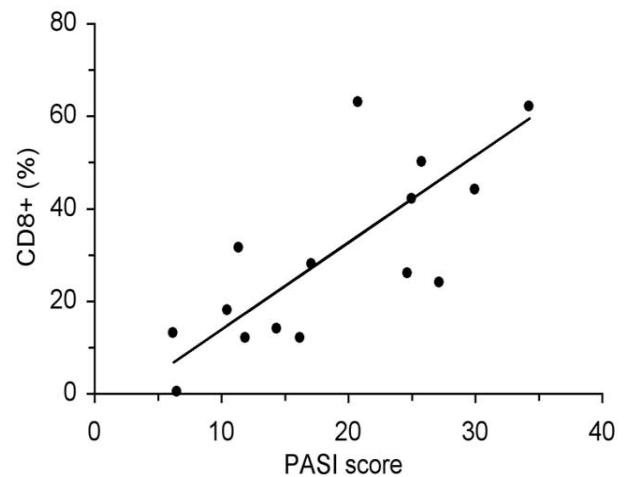


Abbildung 6: Verteilung aktivierter T-Zellen in psoriatischen Plaques. T-Zellen, emigriert aus psoriatischen Plaques wurden nach sieben Tagen Kultivierung mittels FACS wie unter Material und Methoden beschrieben analysiert. Die FACS-Analyse wurde dabei auf $CD3^+$ Zellen limitiert; der PASI-Score bei Biopsieentnahme bestimmt. Abbildg.6a: Korrelation zwischen $CD3^+CD25^+$ T-Zellen und PASI-Index ($r = 0.62$). Abbildg.6b: Korrelation zwischen $CD8^+CD25^+$ T-Zellen und PASI-Index ($r = 0.76$)

Wie erwartet konnte eine starke Korrelation zwischen den $CD25$ -exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen und der Anzahl von $CD4^+$ Lymphozyten, die insgesamt nach einer Woche aus der Haut ausgewandert waren, festgestellt werden ($r = 0.94$). Befinden sich also viele $CD4^+$ T-Zellen in Kultur, kann man davon ausgehen, dass die meisten von ihnen auch $CD25^+$, also aktiviert, sind. Diese Beobachtung lässt sich ebenfalls auf das Verhältnis zwischen $CD25$ -exprimierenden $CD8^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen insgesamt übertragen ($r = 0.90$). Zusammengefasst sprechen unsere Daten dafür, dass die Isolation $CD25^+$ Zellen aus psoriatischen Plaques eine funktionell relevante Population für die Herstellung von T-Zell-Klonen darstellen können. Was weitere klinische Merkmale betrifft, wie Alter bei Erstmanifestation und Familiengeschichte, so konnte in Bezug auf die $CD25$ -Expression $CD3^+$ T-Zellen, keine Korrelation festgestellt werden.

4.2.1 MACS-Sortierung aktivierter T-Zellen

Um aus den heterogenen Zellpopulationen T-Zell-Klone zu erhalten, erstellten wir als nächstes ein Protokoll zur T-Zell-Sortierung. Vorversuche hatten gezeigt, dass durch die Sortierung „unberührter“ T-Zellen über Negativ-Selektion nur Fraktionen von geringer Reinheit generiert werden konnten, wohingegen durch die Sortierung via CD3-Antigen, T-Zellen erhalten wurden, die unfähig zur *in vitro*-Proliferation waren, möglicherweise durch eine TZR-Blockade durch den zur Sortierung benutzten Antikörper. Die oben zusammengefassten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CD25⁺-Fraktion tatsächlich aktivierte T-Zellen enthält, was sich in der Gesamtverteilung der CD4⁺/CD8⁺-Sub-Populationen widerspiegelt. Aus diesem Grund unterzogen wir die aus den inflammatorischen Biopsien emigrierten T-Zellen einer positiven MACS-Sortierung via CD25. Da durch die Sortierung von Zellen unmittelbar nach Biopsie-Entnahme durch mechanische Zerstörung oder enzymatische Zersetzung nur eine sehr geringe Anzahl an Zellen oder eine nur unbefriedigende Proliferation der Klone beobachtet werden konnte, ließen wir die Zellen zunächst für sieben Tage aus den Hautproben emigrieren, bevor sie sortiert wurden.

Um eine Aussage über die Effizienz des Reinigungseffektes der CD25⁺ Zellen von den CD25⁻ Zellen treffen zu können, wurde der Anteil der CD25⁺T-Zellen von den CD3⁺Zellen vor und nach Sortierung verglichen. Wenngleich die Ausbeute nach Sortierung sehr gering war und der prozentuale Anteil an CD25⁺T-Zellen von allen CD3⁺Zellen vor der Sortierung zwischen den einzelnen Patienten stark schwankte, erhielt man dennoch durch diese Prozedur eine mittlere Anreicherung der CD25⁺ T-Zellen auf nahezu 86% bei vierzehn Patienten (Tabelle 2). Aufgrund des hohen Reinheitsgrades nach Sortierung läßt sich mithin festhalten, dass die CD25-Sortierung via MACS eine Isolierung aktivierter T-Zellen aus Plaques psoriatisch veränderter Haut ohne mechanische Belastung erlaubt und eine schnelle und reproduzierbare Methode darstellt, um aktivierte T-Zellen zu isolieren.

Tabelle 2*

Vor Sortierung % CD25 ⁺ Zellen	46.1 ± 21.3
Nach Sortierung % CD25 ⁺ Zellen	86.1 ± 8.8
Anreicherungsfaktor	2.2 ± 0.8
Ausbeute (absol. Zellzahl)	4823 (337 – 22753)

*Reinigung von CD25⁺ Zellen emigriert aus psoriatischen Plaques via MACS. Die aufgeführten Daten stellen den Mittelwert ± Standardabweichung aus Zellen von 14 Patienten dar. Die Ausbeute an absoluten Zellzahlen (Mittelwert und Variationsbereich) ist angegeben für den Ertrag an CD25⁺ Zellen nach Sortierung.

4.2.2 Klonierungseffizienz CD25⁺ sortierter Zellen

Als nächsten Schritt untersuchten wir die Effizienz der Klonierung MACS-sortierter T-Zellen unter verschiedenen Bedingungen. Nach der Sortierung wurden die CD25⁺ Zellen bei einer Dichte von 1 Zelle/well in der Gegenwart bestrahlter PBMC, sowie in der Präsenz einer der folgenden stimulierenden Zusätze ausplattiert: PHA-L, stimulatorisches α CD3, α CD3 und α CD28, randomisierte Peptidbanken, die das Wachstum von T-Zell-Klonen unterstützen (90). Die Resultate dieser Experimente, durchgeführt mit Zellen von insgesamt zehn Patienten, sind in Tabelle 3 zusammengefasst

Tabelle 3*

Stimulatorische Bedingung	Anzahl der Responder	Klonierungseffizienz ¹
none	5 / 6	3.6
PHA	3 / 5	2.7
α CD3	3 / 5	6.0
α CD3 + α CD28	1 / 5	3
X19	2 / 6	3
X9GK	2 / 6	6
X9GKK	2 / 6	7

*CD25⁺ MACS- sortierte Zellen wurden geklont mittels sog. „limitierender Verdünnung“ (limiting dilution; s. Material und Methoden für Details der Prozedur). ¹Ausgedrückt als mittlere Anzahl der Klone pro 96-well Platte bei einer Ausgangszellzahl von einer Zelle pro well. „Responder“ = Patienten, deren T-Zellen Wachstum von klonalen T-Zellen ergab.

Von den anfangs zur Stimulation eingesetzten Peptidbanken aktivierte keine die Zellen so stark, dass man von einem deutlichen stimulatorischen Effekt hätte sprechen können, den eine bestimmte Bank auf die Proliferation der Zellen ausübt. Wird keine Peptidbank zur Stimulation eingesetzt, ist zwar die Klonierungseffizienz nicht so hoch wie mit Bank, dafür zeigte sich allerdings bei fast allen Patienten, deren Zellen bei einer Ausgangszellzahl von einer Zelle pro well kloniert wurden, ein Wachstum von Klonen. Bei der ebenfalls getesteten, hier aber nicht dargestellten, Ausgangszellzahl von 0,3 Zellen/well ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Einsatz einer Peptidbank oder der Negativkontrolle nachweisen. Hier war die Ausbeute an Klonen insgesamt so gering, dass sie keine Interpretation über die Höhe des stimulatorischen Effektes einer bestimmten Bank zulässt.

Die aus diesem Grund von uns eingesetzten anderen Stimulatoren, welche die Proliferation von T-Zell-Klonen aus psoriasischen Plaques optimieren sollten, waren ebenfalls nicht dazu in der Lage, die Klonierungseffizienz beträchtlich zu erhöhen. Bemerkenswerterweise erhöhte auch der

Zusatz starker exogener TZR-Aktivatoren (α CD3 oder PHA-L) nicht die Klonierungseffizienz. Dies zeigt, dass das klonale Wachstum der CD25⁺ sortierten Zellen nicht durch eine suboptimale TZR-Aktivierung limitiert ist. Die Klonierungseffizienz schwankte insgesamt zwischen 2.7 und 7 Klonen pro 100 wells. Keine einzige Bedingung unterstützte das Wachstum aller getesteten Zellen.

4.3 Expansion von T-Zell-Klonen aus psoriatische Plaques

Nachdem T-Zell-Klone durch ‚limiting dilution‘ unter verschiedenen Bedingungen generiert werden konnten, versuchten wir, diese Klone zu expandieren. Ziel dabei war es, mindestens eine Anzahl von 10^7 Zellen pro Klon zu erhalten, da diese für die Testung der Rezeptorspezifität der Klone durch die Peptidbibliotheken benötigt wird. Die genaue Vorgehensweise der Expandierung der T-Zell Klone wurde bereits unter 3.2.6. ausführlich erläutert.

Zunächst untersuchten wir die klonale Proliferation CD25⁺ sortierter T-Zellen von fünf Klonen vier unterschiedlicher Patienten in der Präsenz von entweder stimulatorischem α CD3, α CD28 (nicht dargestellt) oder PHA-L in Gegenwart oder Abwesenheit der Apoptoseinhibitoren α CD95L oder dem Caspase 8-Inhibitor DEVD-CHO (s. Abbildung 7). Der Zusatz von α CD3 und α CD28 in Kombination zeigte eine so geringe Proliferation von Zellen, dass sie nach einiger Zeit nicht mehr von uns getestet wurden. Die resultierende Klon-Expansion unter den übrigen getesteten Bedingungen betrug sieben Tage nach Kultivierung das zwei- bzw. dreifache der Ausgangszellzahl und war unter allen getesteten Bedingungen in etwa vergleichbar, so dass auch hier von keinem Vorteil durch den Einsatz einer bestimmten stimulatorischen Substanz in Kombination oder alleine gesprochen werden konnte. Das zur Verbesserung der Expansionsfähigkeit ebenfalls aufgrund in der Literatur beschriebener antiapoptotischer Eigenschaften eingesetzte Anti-Oxidans MnTBAP (67) zeigte sowohl in Kombination mit PHA, α CD3 und α CD3+ α CD28 keinen oder einen eher nachteiligen Effekt auf die Expansion der Klone, so dass es keine Aussage hinsichtlich der Expansionseffizienz zuließ.

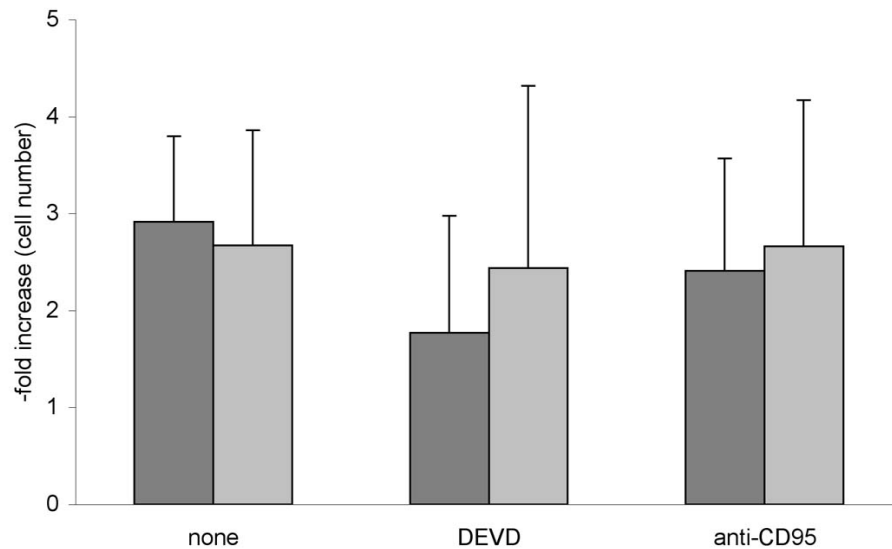


Abbildung 7: Proliferation von T-Zell-Klonen aus psoriatischen Plaques *in vitro*. T-Zell Klone (n=5) wurden auf 96-well Rundbodenplatten bei einer Ausgangszellzahl von etwa 10^4 Zellen/well auf die unterschiedlichen Bedingungen PHA-L (dunkel-graue Säulen), bzw. anti-CD3 (hell-graue Säulen) aufgeteilt (siehe Abschnitt 3.6.2.). Diese wurden für sieben Tage in der Gegenwart oder Abwesenheit (erste Balken) der Apoptoseinhibitoren DEVD (zweite Balken) oder anti-CD95 (dritte Balken) expandiert. Danach wurde die Zunahme der Zellzahl determiniert. Die dargestellten Säulen repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf Klonen vier unterschiedlicher Patienten.

Nachdem durch die Kombination von PHA-L, anti-CD3 und anti-CD3 + anti-CD28 mit einem Apoptosehemmer alleine keine Verbesserung der Expansion erreicht werden konnte, unternahmen wir noch den Versuch, die Apoptosehemmer und MntBAP zusätzlich miteinander zu kombinieren (s. Abschnitt 3.2.6.).

Da die Apoptose klonaler T-Zellen von besonderer Relevanz bei der Vermittlung des sog. aktivierungsinduzierten Zelltodes (activation-induced cell death, AICD) sein könnte, untersuchten wir die Effekte anti-apoptotischer Reagenzien genauer an T-Zellen eines Patienten, dessen T-Zellen stark proliferierten. Schon vor der CD25⁺-Sortierung zeichneten sich die CD3⁺ Zellen dieses Patienten durch einen besonders hohen Anteil an CD25⁺ Zellen (84%) aus. Nach der CD25⁺-Sortierung ließ sich dieser Anteil sogar auf 93,5% steigern. Wir kultivierten Populationen, die zwei bis fünf Klone enthielten, in der Gegenwart oder Abwesenheit von stimulatorischem anti-CD3 mit oder ohne DEVD oder anti-CD95 für sieben Tage. Die Zellen wurden anschließend gezählt und der Aktivierungs-Status sowie die Präsenz apoptotischer Zellen durch FACS-Analyse über CD25-und Annexin-V-Färbung ermittelt. Die Resultate sind in Abbildung 8 dargestellt.

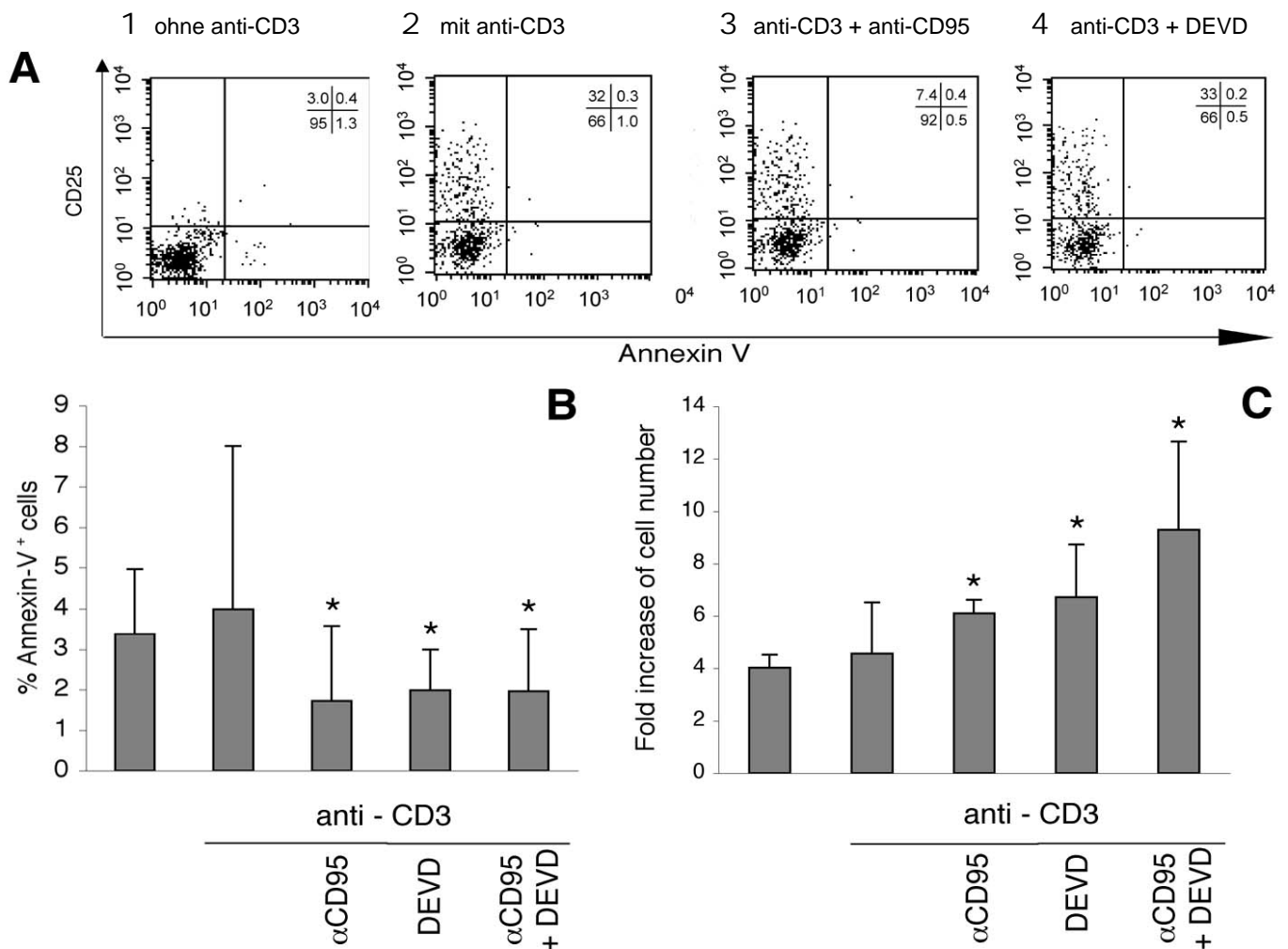


Abbildung 8: Effekt anti-apoptotischer Reagenzien auf die Expansion von T-Zell-Klonen. Oligoklonale T-Zellen wurden auf 96-well Rundbodenplatten bei einer Zelldichte von ca. $1,5 \times 10^4$ Zellen pro well auf die unterschiedlichen Bedingungen aufgeteilt (siehe Punkt 3.2.6. im Material- und Methoden-Teil). Nach sieben Tagen Kultivierung wurden die Zellen gefast und gezählt. **Abbildung 8a:** Die FACS-Analyse zeigt den Status der Aktivierung (CD25-Färbung) und die Häufigkeitsverteilung apoptotischer Zellen (Annexin-V-Färbung) von klonalen T-Zellen, die in der Abwesenheit (1. Graph) oder in Gegenwart von entweder stimulierendem anti-CD3 alleine (2.) oder zusätzlich mit anti-CD95 (= α CD95) (3.) oder dem Caspase-Inhibitor DEVD (4.) expandiert worden waren. **Abbildung 8b:** Häufigkeitsverteilung apoptotischer Zellen (gemessen als Annexin-positive Zellen) in klonalen T-Zell-Populationen, die in der Abwesenheit (erste Säule) oder Gegenwart von anti-CD3 (zweite Säule) +/- der dargestellten anti-apoptotischen Reagenzien expandiert wurden. Die Daten stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf verschiedenen Klon-Populationen dar, die durch FACS-Analyse (siehe 8a) ermittelt worden waren. **Abbildung 8c:** Proliferation von klonalen T-Zell-Populationen, die sieben Tage unter den dargestellten Bedingungen expandiert wurden. Die gezeigten Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf separaten klonalen Populationen. * = $p < 0.05$ (T-Test).

Insgesamt ergab die Auswertung, dass die Kombination von anti-CD3 mit Zugabe der beiden Apoptoseinhibitoren anti-CD95 und DEVD den stärksten Effekt auf die Proliferation der Zellen zu besitzen scheint (vgl. **Abbildung 8c**). Unter diesen Bedingungen wuchs die anfänglich

ausplattierte Zellzahl auf das 9-fache. Die getesteten Bedingungen anti-CD3⁺ und anti-CD95 und anti-CD3 + DEVD scheinen eine gleichermaßen hohe stimulatorische Potenz auf die Vervielfältigung der Ausgangszellzahl zu besitzen. Die Gegenwart Annexin-V-positiver Zellen war in der Abwesenheit spezifischer TZR-Stimulation, bzw. der Gegenwart von anti-CD3 alleine detektierbar, wobei ihre Frequenz dezimiert werden konnte durch die Zugabe von anti-CD95, DEVD, oder durch Kombination der beiden Anti-Apoptose-Reagenzien (vgl. Abbildung 8b). Auch das Verhältnis zwischen großen aktivierten Blasten und kleineren T-Zellen ist bei Zugabe von anti-CD3 + anti-CD95 + DEVD am größten, d.h. zugunsten der großen Zellen verschoben. (Daten nicht dargestellt). Betrachtet man die CD25-Expression der proliferierenden T-Zellen insgesamt, so wird deutlich, dass nahezu unter allen Bedingungen der Anteil der CD25⁺ Zellen bei ca. 80 Prozent liegt. Bei der Negativkontrolle ist er etwas geringer und beträgt etwa 50 Prozent. Alle Zellen zeigen also eine hohe Aktivität, ausgedrückt durch den Anteil an CD25 exprimierenden Zellen (Daten nicht dargestellt). Zusammengefasst deuten die Resultate darauf hin, dass die Blockierung der Apoptose unterschiedliche Effekte auf T-Zellen von verschiedenen Spendern ausübt. Besonders auf stark proliferierende Zellen übt die Blockierung einen starken Effekt aus. Hierbei wird durch die Kombination von anti-CD3 + anti-CD95 + DEVD anscheinend die stärkste Stimulation auf die Proliferation klonaler T-Zellen erreicht.

4.4 Peptidbibliotheken bei polyklonalen T-Zell-Linien

4.4.1 Expansion polyklonaler T-Zell-Linien

Da trotz des Einsatzes verschiedener stimulierender Konditionen keine ausreichende Zellzahl, von mindestens 10^7 Zellen, an Klonen generiert werden konnte, die für den Einsatz der Peptidbibliotheken notwendig ist, gingen wir dazu über, polyklonale T-Zell-Linien (TZL) zu expandieren, um diese anschließend auf ihre Rezeptorspezifität zu testen. Mit der Kultivierung polyklonaler TZL ließen sich die T-Zellen insgesamt besser und schneller expandieren. Dennoch stellt auch bei der Verwendung von nun polyklonalen TZL die zu geringe Ausbeute an expandierten Zellen den hauptsächlich limitierenden Faktor für die Durchführung eines Experimentes mit den Peptidbibliotheken dar. Von sieben Patienten, deren polyklonale T-Zellen expandiert werden sollten, proliferierten nur die TZL von zwei Patienten (Patient A und Patient B) so stark, dass wir den Versuch mit den Peptidbibliotheken erfolgreich an ihnen durchführen konnten. Von Patient A konnten innerhalb von 28 Tagen $3,6 \cdot 10^7$ T-Zellen expandiert werden und von Patient B innerhalb von 18 Tagen $1,5 \cdot 10^7$ Zellen. Ein weiterer limitierender Faktor war dabei

nicht nur die Anzahl der polyklonalen TZL, sondern auch der mitunter beeinträchtigte Aktivierungszustand dieser Zellen. Zeigten die Zellen von vornherein keine starke Proliferation, so erübrigte sich eine Testung dieser Zellen durch den Einsatz der Peptidbibliotheken auf ihre Rezeptorspezifität. Es konnte dann keine Reaktion mehr auf die Bibliotheken weder hinsichtlich Inhibition noch Stimulation erreicht werden. Die Zellen mussten sich also in einem mittleren aktivierten Zustand befinden, um optimal für den Versuch eingesetzt werden zu können.

4.4.2 Stimulation von T-Zell-Linien mit kombinatorischen Peptid-Bibliotheken *in vitro*

Nachdem wir die polyklonalen TZL von Patient A und B expandiert hatten, setzten wir diese für die Testung mit den unterschiedlichen Peptidbibliotheken ein. Wie in Material und Methoden dargestellt, handelt es sich bei diesen um sog. kombinatorische Bibliotheken, bei denen jeweils Nonapeptide (zur präferentiellen Stimulation von CD8⁺Zellen) oder Decapeptide (zur präferentiellen Stimulation von CD4⁺ Zellen) randomisiert synthetisiert sind, so daß jeweils eine Sub-Bibliothek an einer einzigen Position eine bekannte Aminosäure enthält. Für eine Peptid-Position werden also 20 Sub-Bibliotheken synthetisiert. Die zu untersuchenden T-Zellen werden dann jeweils mit den einzelnen Peptidbibliotheken inkubiert, um stimulatorische bzw. inhibitorische Effekte einzelner Aminosäuren an definierten Positionen zu bestimmen. Insgesamt wurden mit den expandierten T-Zell-Linien drei Experimente erfolgreich durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden einzeln aufgeführt werden sollen. Zur Verfügung standen uns eine Deca-Bibliothek (PCL 99-1) und zwei Nona-Peptidbibliotheken (PCL 97-3 und TPI-921). Die Daten wurden, wie unter Material und Methoden bereits beschrieben, anhand der BrdU⁺-FACS-Analyse (Zellproliferation) und der FSC/SSC-FACS-Analyse (Anteil großzelliger aktivierter T-Zell-Blasten) ausgewertet. Die BrdU⁺-Analyse beantwortet die Frage, wie viele Zellen der großen Lymphoblasten-Population in den letzten 24 Stunden die S-Phase des Zellzyklus durchgemacht haben. Durch die FSC/SSC-Analyse hingegen erfährt man, wie viele Zellen sich im aktivierten Zustand befinden. Dabei wird angenommen, dass es sich bei der großen Lymphoblasten-Population um die aktivierten T-Lymphozyten handelt.

4.4.2.1 Experiment 1

Da die hier beschriebenen Versuche erstmalig klären sollten, ob bzw. inwieweit polyklonale T-Zell-Linien mit diesem Verfahren charakterisiert werden können, wurden nur 2 Positionen (Position 4 und 5) der Nona- bzw. Dekapeptid-Banken exemplarisch charakterisiert. Für die TZL von Patient A wurden zwei Peptidbibliotheken eingesetzt: Die Nona- Peptidbibliothek TPI- 921 und die Dekapeptidbibliothek PCL 99-1. Durch die Auswertung der BrdU⁺-Analyse erkennt man, dass in der Negativkontrolle annähernd 20% der Zellen BrdU⁺ sind. PHA (Positivkontrolle) vermag den Anteil an BrdU⁺ Zellen auf 40% zu erhöhen. Die optimale PHA-Konzentration liegt dabei bei 3 µg/ml. Beträgt die PHA-Konzentration 10 µg/ml, fällt der Anteil an BrdU⁺ Zellen wieder ab. Obwohl hier also eine Stimulation von PHA beobachtet werden kann, zeigen die Peptide selbst durchgehend eine inhibitorische Wirkung auf die BrdU⁺ Population (siehe Abbildung 9A). Aus der FSC/SSC- Analyse wird ersichtlich, dass in den Negativkontrollen annähernd 30% große CD3⁺ Zellen existieren, die durch den Einsatz von PHA bis auf 50% gesteigert werden können. Hier können demnach durch die Peptidgemische sowohl Inhibition, als auch Stimulation erreicht werden. Es besteht weiterhin erwartungsgemäß eine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil großer Blasten und dem prozentualen Anteil an BrdU⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 9B, Graph 2).

Vergleicht man jedoch die Effekte der Peptid-Sub-Bibliotheken auf die Anzahl von Blasten sowie der BrdU⁺-Population (s. u. Tabelle 4), so zeigt sich keine einheitlich auf beide Parameter negativ bzw. positiv nachweisbare Wirkung einzelner Peptide. Weiterhin besteht nur eine geringe Übereinstimmung hinsichtlich stimulatorischer bzw. inhibitorischer Wirkung der einzelnen Peptidgemische in den beiden Bibliotheken TPI-021 und PCL 99-1. Nur bei vier der auf Position vier und fünf getesteten Peptid-Mixturen besteht eine leichte Übereinstimmung in der Fähigkeit, die T-Zellen zu inhibieren bzw, zu stimulieren. Insgesamt betrachtet reagieren mehr T- Zellen auf die Nona- Bibliothek TPI-921 als auf die Dekapeptid-Bibliothek PCL 99-1 (Tabelle 4).

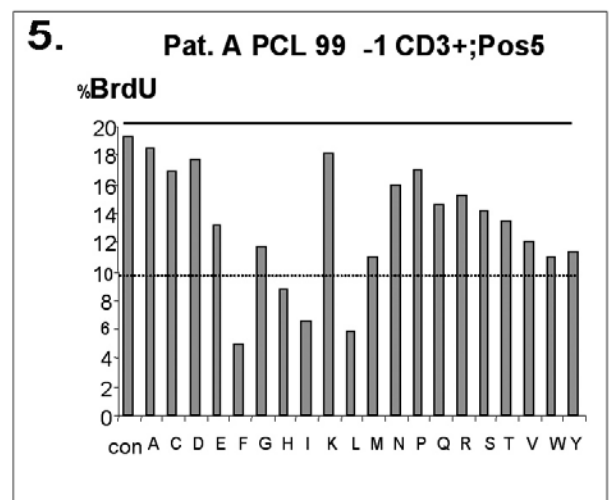
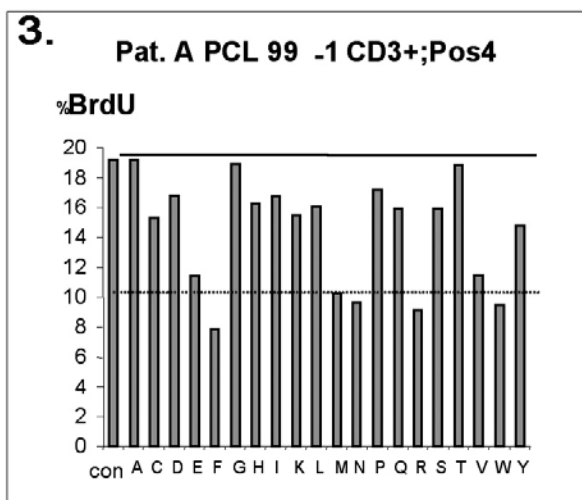
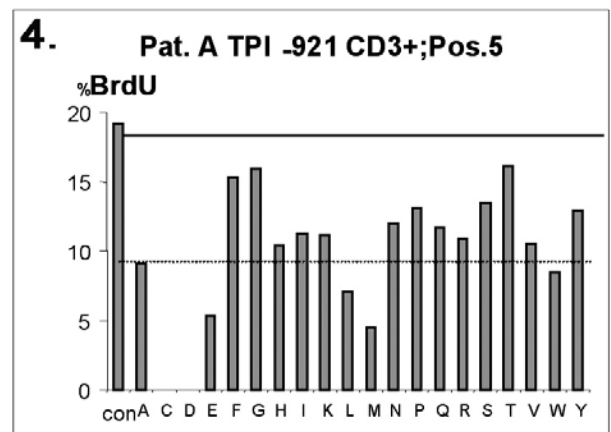
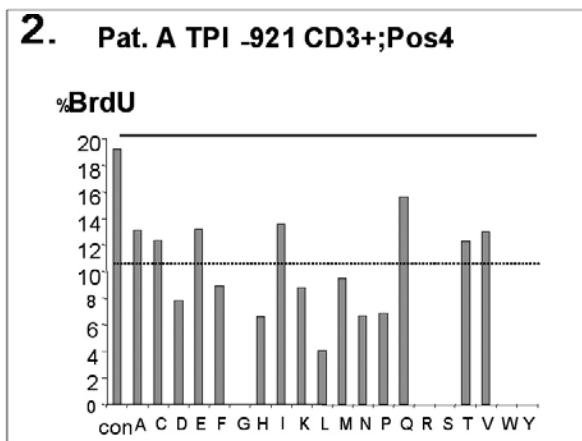
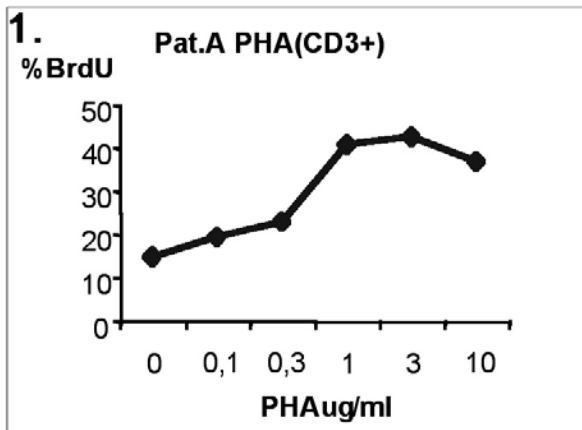
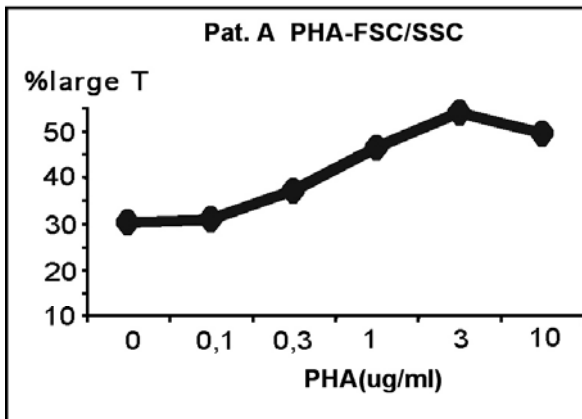
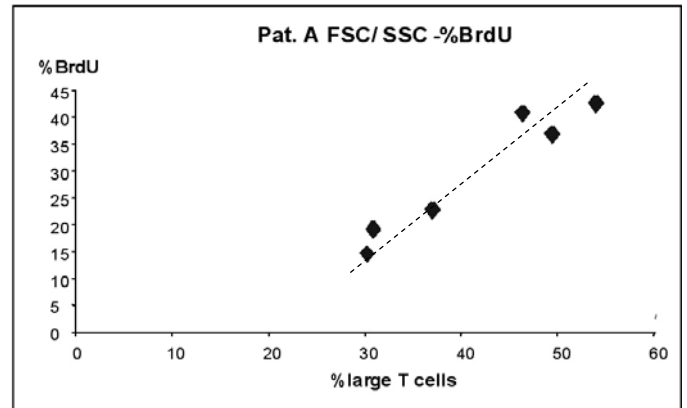


Abbildung 9A: Von Patient A wurden T-Zellen expandiert und anschließend deren TZR auf ihre Spezifität anhand der Peptidbibliotheken TPI-921 und PCL 99-1 getestet (Experiment 1). Die bekannten Aminosäuren befanden sich entweder an vierter (links) oder fünfter (rechts) Position der Peptidketten. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an BrdU⁺ Zellen von allen CD3⁺ T-Zellen, aufgetragen gegen die einzelnen definierten Aminosäuren (9A 2.-5.), bzw der getesteten Konzentrationen von PHA (9 A1.). Die durchgezogene Linie gibt die prozentuale BrdU-Konzentration des Negativkontrollwertes an (=20%). Die gestrichelte Linie gibt die vorher als für einen inhibitorischen Effekt (-10%) als signifikant definierte Grenze an. Con = Negativkontrollwert.

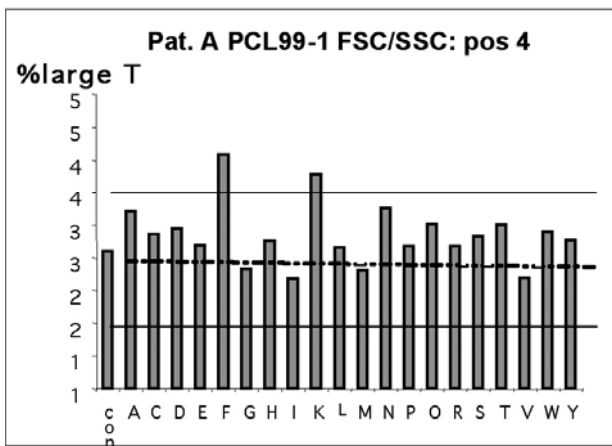
1.



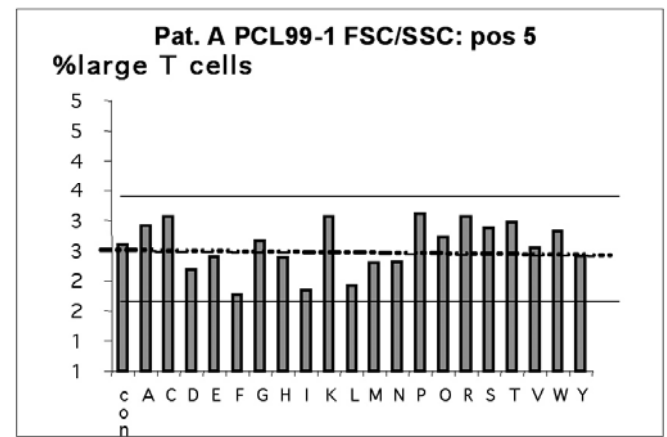
2.



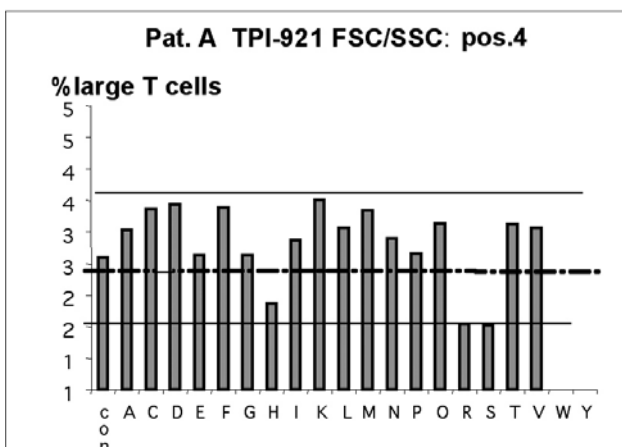
3.



4.



5.



6.

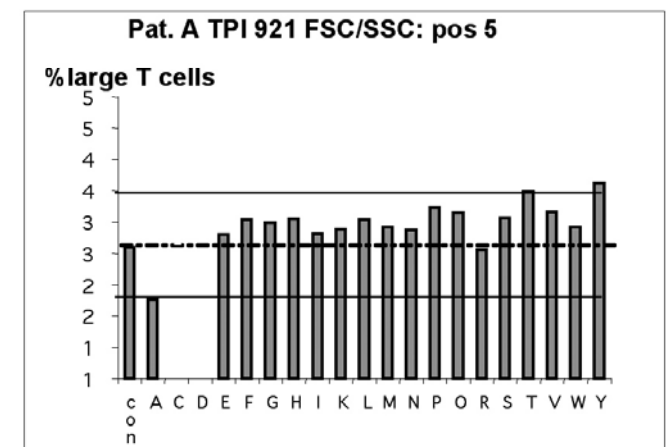


Abbildung 9B. Experiment 1. Auswertung der FSC/SSC FACS-Analyse. Dargestellt ist der prozentuale Anteil großer Lymphoblasten in Gegenwart der einzelnen Aminosäuren (Graphen 3-6.), bzw. der eingesetzten Konzentration von PHA (Graph 1.), bzw. des prozentualen Anteils an BrdU⁺ T-Zellen (Graph 2.). Die gestrichelte horizontale Linie gibt an, wieviel Prozent der Lymphozyten ohne Zugabe von PHA oder Peptidgemisch aktiviert war. Die durchgezogenen Linien zeigen die Grenzen (entsprechend dem Negativkontrollwert $\pm 10\%$), deren Über- bzw. Unterschreitung als eine signifikante Stimulation bzw. Inhibition der TZL aufgrund der eingesetzten Peptidbibliothek bewertet wurde.

Tabelle 4*

	Position 4:				Position 5:			
	TPI 921		PCL 99-1		TPI 921		PCL 99-1	
	BrdU	FSC/SSC	BrdU	FSC/SSC	BrdU	FSC/SSC	BrdU	FSC/SSC
a					x			
c					n.d.	n.d.		
d	x				n.d.	n.d.		
e					x			
f	x		x	s			x	
g	n.d.							
h	x						x	
I							x	
k	x			s				
l	x				x		x	
m					x			
n	x							
p	x							
q								
r	n.d.	x	x					
s	n.d.	x						
t								
v								
w	n.d.	n.d.			x			
y	n.d.	n.d.				s		

* Effekte randomisierter Peptid-Bibliotheken mit definierten Aminosäuren in Position 4 bzw. 5 von Nonapeptiden (TPI 921) bzw. Decapeptiden (PCL 99-1) auf die TZL von Patient A (Experiment 1). Ausgewertet wurde nach BrdU⁺ bzw. FSC/SSC-Analyse. **x** = Inhibition von 10 % verglichen zur Negativkontrolle; **s** = Stimulation von 10 % verglichen zur Negativkontrolle. n.d. = nicht determiniert (Rohdaten, die entweder aufgrund einer zu geringer Zellzahl oder aufgrund einer Inkonsistenz zwischen den Duplikaten nicht auswertbar waren.)

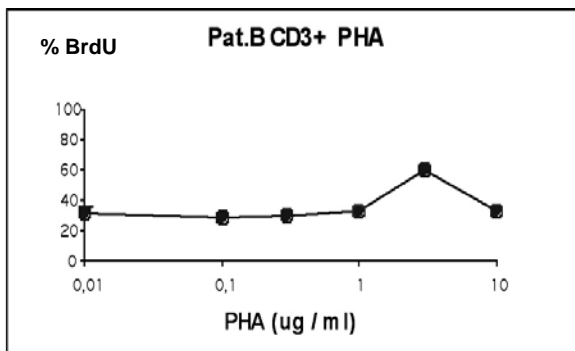
4.4.2.2 Experiment 2

Die verwendeten Bibliotheken waren auch hier wieder TPI-921 und PCL 99-1. Die verwendeten TZL stammten dieses Mal von Patient B. Betrachtet man die Analyse der BrdU⁺ FACS-Auswertung, sind bei den Negativ-Kontrollen (TZL plus PBMC, aber ohne PHA oder Peptide) ca. 30% der Zellen BrdU⁺, d.h. die Zellen dieses Patienten sind bereits basal stärker proliferativ. Nur durch eine PHA- Konzentration von 3 µg/ml kann der Anteil an BrdU⁺ Zellen noch erhöht werden, wenngleich auch nur um 10 Prozent (siehe Abbildung 10A 1.). Da BrdU⁺ anzeigt, dass dieser Anteil der Zellen die S-Phase während der 24-stündigen BrdU-Pulsation durchlaufen hat und eine S-Phase pro Zellzyklus (ca. 18 Stunden), 5-8 Stunden beträgt, sind alle noch zirkulierenden Zellen mit BrdU metabolisch markiert. Die Peptidbibliotheken zeigen bei diesem Patienten ein variables Inhibitions muster, welches dadurch charakterisiert ist, dass die Inhibitionseffekte im Wesentlichen auf die Peptid-Mixturen zurückzuführen sind, da in deren Abwesenheit keine solchen Effekte beobachtet werden (siehe Abbildung 10A 2.-5.). Teilweise besteht bei diesem Patienten eine Konsistenz zwischen TPI-921 und PCL 99-1. Der größte

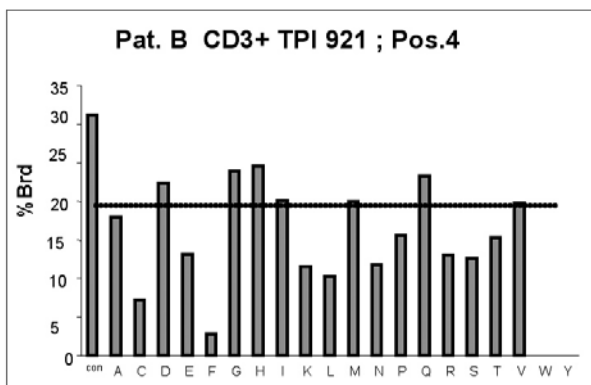
Anteil der Zellen, der auf die Zugabe der Peptidgemische mit einem Rückgang der DNA-Replikationsrate reagiert, besteht aus CD4⁺ Zellen.

Die FSC/SSC-Analyse zeigt in Übereinstimmung mit den BrdU-Daten, dass sich in den Kontrollen bereits 60% große T-Lymphoblasten befinden (siehe Abbildung 10B 1.). Durch Zugabe von PHA läßt sich entsprechend keine wesentliche Zunahme an großen (aktivierten) Lymphozyten mehr erreichen. Wie bereits in der BrdU⁺- Analyse beobachtet, zeigen die Peptidbibliotheken hauptsächlich einen inhibitorischen Effekt auf die TZL (siehe Abbildung 10B 2.-5.).

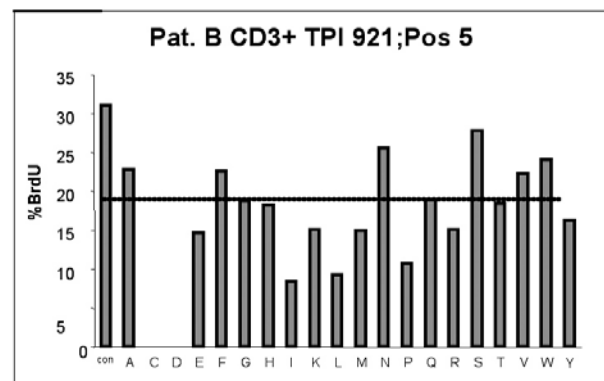
1.



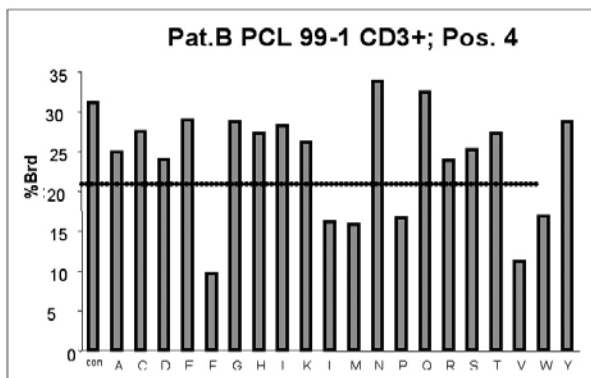
2.



3.



4.



5.

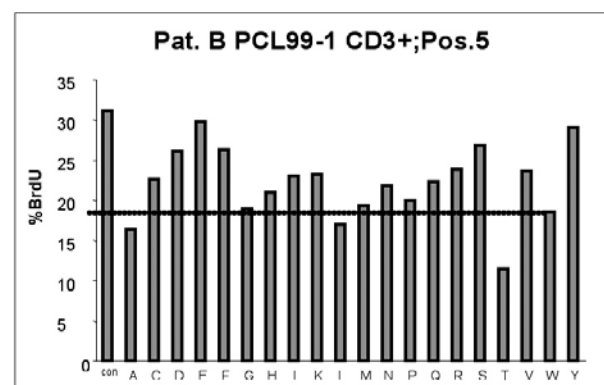
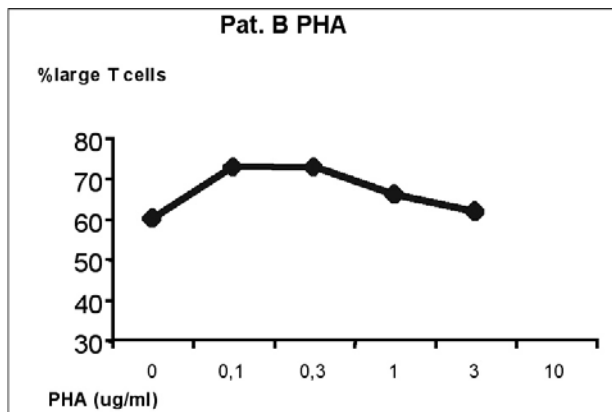
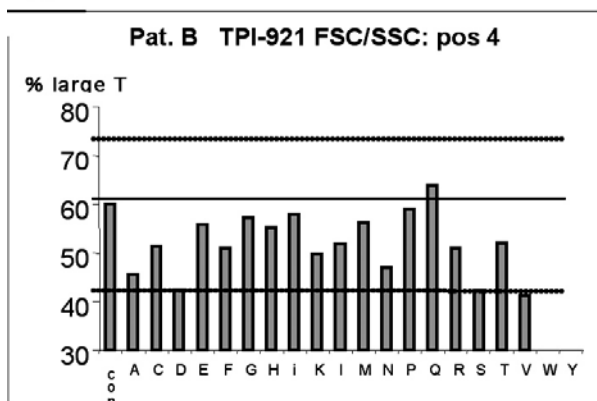


Abbildung 10A. Experiment 2. Von Patient B wurden TZL expandiert und anschließend deren TZR auf ihre Spezifität anhand der Peptidbibliotheken TPI-921 und PCL 99-1 getestet. Die bekannten Aminosäuren befanden sich entweder an vierter (links) oder fünfter (rechts) Position der Peptidketten. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an BrdU⁺ Zellen von allen CD3⁺ T-Zellen aufgetragen gegen die einzelnen definierten Aminosäuren (10A 2.-5.), bzw der getesteten Konzentrationen von PHA (10A 1.). Die durchgezogene horizontale Linie markiert eine Reduktion von 10 % des in Gegenwart von PHA gemessenen Wertes, dessen Unterschreitung als signifikant gewertet wurde.

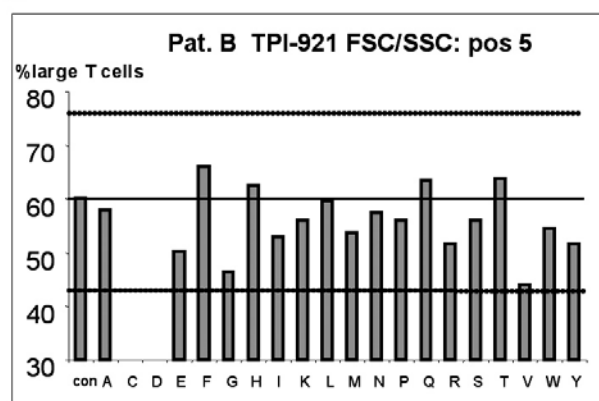
1.



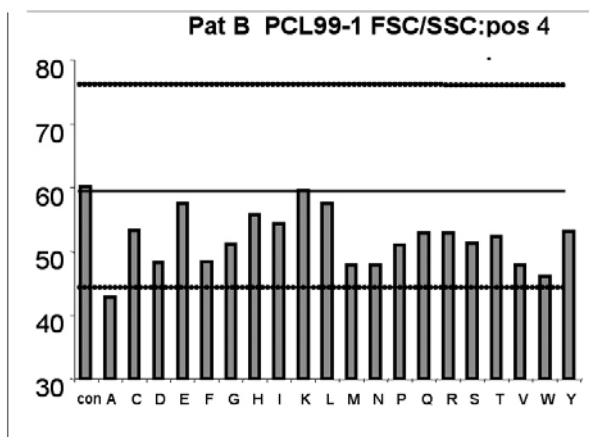
2.



3.



4.



5.

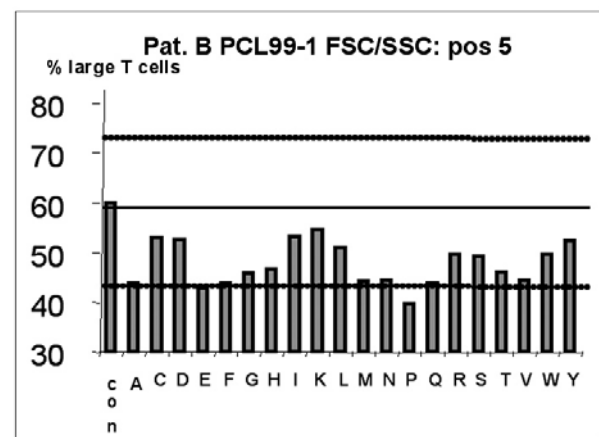


Abbildung 10B. Auswertung der FSC/SSC-Analyse. Dargestellt ist der prozentuale Anteil großer Lymphoblasten in Gegenwart der einzelnen Aminosäuren (10A 2-5) bzw. eingesetzten Konzentration von PHA (10A 1). Die durchgezogene horizontale Linie gibt an, wieviel Prozent der Lymphozyten bereits ohne Zugabe von PHA oder Peptidgemisch aktiviert sind. Die gestrichelten Linien zeigen die von uns definierten Grenzen (Negativkontrollwert $\pm 15\%$), deren Über- bzw. Unterschreitung als eine Stimulation bzw. Inhibition der TZL aufgrund der eingesetzten Peptidbibliotheken bewertet wurde.

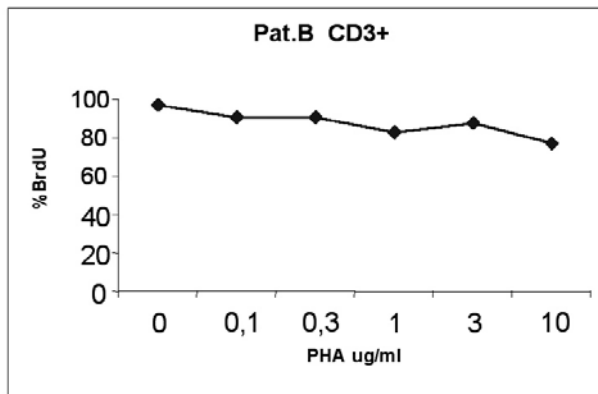
4.4.2.3 Experiment 3

Bei diesem Experiment wurde die carboxylierte Nona-Peptidbibliothek PCL 97-3 eingesetzt. Die verwendeten TZL stammen von demselben Patienten, dessen TZL bereits für Experiment 2 eingesetzt wurden (Patient B). Experiment 3 wurde 30 Tage nach Experiment 2 durchgeführt, d.h. die TZL befanden sich einen Monat länger in Kultur. Aus der Beurteilung der BrdU⁺-Analyse (s. Abbildung 11A. 1) ergibt sich, dass bereits 100 % der großen Lymphoblasten ohne Zugabe von PHA oder Peptiden aktiviert sind (die letzte PHA-Stimulation fand sieben Tage vor Versuchsbeginn statt). Folglich ist durch den zusätzlichen Einsatz von PHA auch keine weitere Stimulation sondern ausschließlich eine Inhibition zu erwarten, was durch unsere Untersuchungen auch bestätigt wurde. Die maximal erreichte relative Inhibition der CD3⁺ Zellen durch die Bibliothek PCL 97-3 liegt bei ca. 40 Prozent. Betrachtet man davon die Population an CD4⁺ Zellen, gelangt man zu ähnlichen Werten. Bei der Population der CD8⁺ Zellen wurden hingegen maximale Inhibitionswerte von annähernd 60 Prozent erreicht (nicht dargestellt).

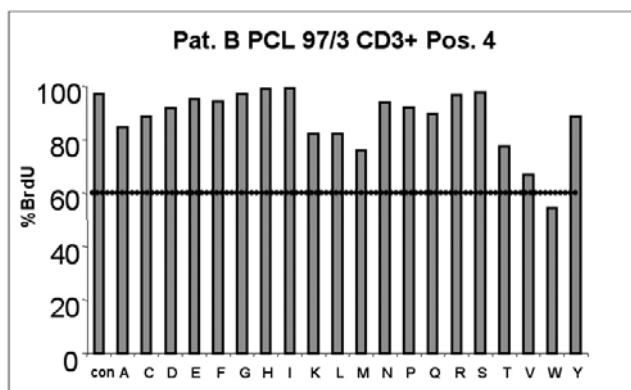
In der FSC/SSC-Analyse liegt der prozentuale Anteil der großen Zellen in den Negativkontrollen bei durchschnittlich ca. 45 Prozent. Durch PHA erreicht man eine leichte Stimulation bis auf 60 Prozent. Durch Zugabe von Peptidgemisch lassen sich die TZL auf einen relativen Maximalwert von 75 Prozent stimulieren. Inhibitorische Effekte werden nicht beobachtet. Die Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass sich nach weiteren 30 Tagen in Kultur und insgesamt zwei Monaten Kultivierung alle großen T- Zellen, nach denen die BrdU⁺- FACS-Analyse gated wurde, im Zellzyklus befinden und der Rest sich gar nicht mehr im großen Lymphozytengate befindet, die Lymphoblastenpopulation als Ganzes jedoch abgenommen hat und nun wieder restimulierbar ist. Vergleicht man nämlich den durchschnittlichen prozentualen Anteil an Lymphoblasten der Negativkontrollen dieses Experimentes, mit dem Anteil an Lymphoblasten vor der *in vitro*-Kultivierung über 30 Tage, so wird deutlich, dass dieser von 60 Prozent auf ca. 45 Prozent abgenommen hat (siehe Abbildung 11B).

Vergleicht man die Aktivität der Bibliotheken untereinander, erkennt man eine geringe Übereinstimmung hinsichtlich stimulatorischer bzw. inhibitorischer Wirkung der einzelnen Peptidgemische. Insgesamt betrachtet reagieren mehr T-Zellen im Sinne einer Einschränkung der DNA-Syntheseleistung auf die Nona- Bibliothek TPI-921, als auf die Banken PCL 99-1 oder PCL 97-3. Weiterhin wird nur bei Einsatz der Bibliothek PCL 97-3 durch die Peptidgemische eine Stimulation der Lymphozyten bei der FSC/SSC-Auswertung beobachtet (s. Tabelle 5).

1.



2.



3.

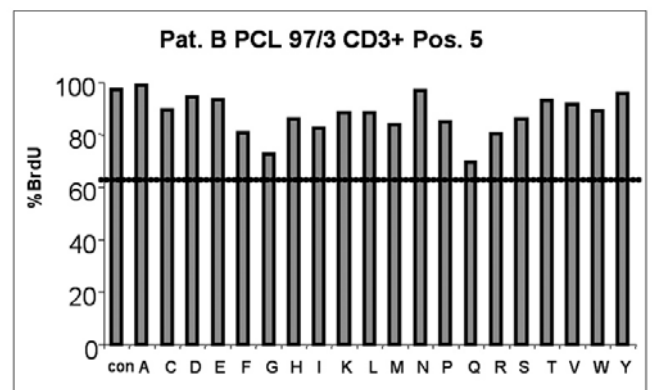
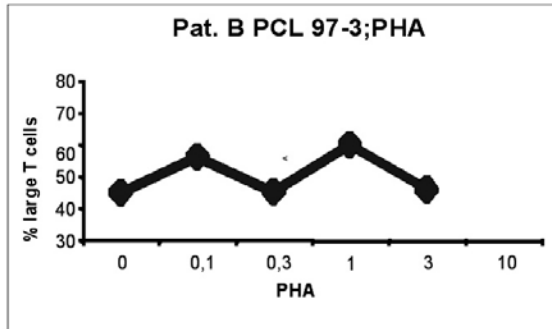
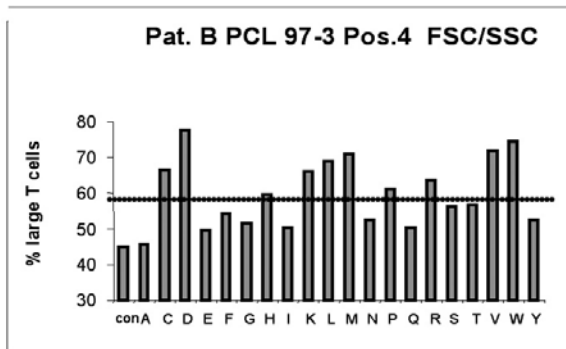


Abbildung 11A. Experiment 3. BrdU-Analyse. Die von Patient B expandierten TZL wurden anhand der carboxylierten Nona-Peptidbibliothek PCL 97-3 auf ihre Rezeptorspezifität getestet. Definierte Aminosäuren befinden sich jeweils an Position vier und fünf des Nona-Peptides. Bei den restlichen acht handelt es sich um randomisierte Aminosäuren. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an BrdU⁺ Zellen von den CD3⁺ T-Zellen insgesamt auf der Ordinate, aufgetragen gegen die einzelnen an ihrer bestimmten Position definierten Aminosäuren (11A 2.u.3.), bzw der getesteten Konzentrationen von PHA (11A 1.). Die gestrichelte Linie gibt die von uns definierte Grenze an (Negativkontrollwert -15%), deren Unterschreitung eine signifikante Inhibition durch die Peptidgemische darstellt. Con = Negativkontrollwert

1.



2.



3.

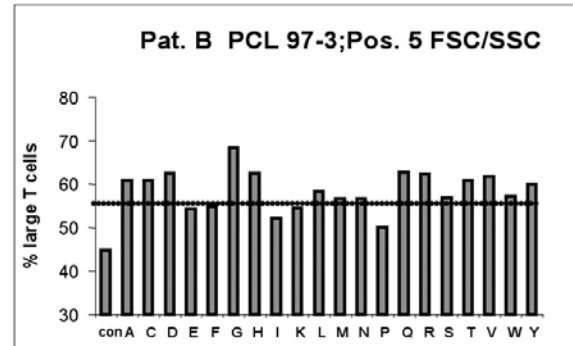


Abbildung 11B. Experiment 3: Auswertung der FSC/SSC-Analyse. Dargestellt ist der prozentuale Anteil großer Lymphoblasten in Gegenwart der einzelnen Aminosäuren (11A 2. u. 3) bzw. von PHA (11A 1.). Die gestrichelte Linie gibt die Grenze an (+ 15% des Negativkontrollwertes), deren Überschreitung als signifikante Stimulation der TZL durch die Peptidbibliothek definiert wurde.

Tabelle 5 : *

Position 4:**Position 5 :**

	TPI 921		PCL 99-1		PCL 97-3		TPI 921		PCL 99-1		PCL 97-3	
	BrdU	FSC/SSC	BrdU	FSC/SSC	BrdU	FSC/SSC	BrdU	FSC/SSC	BrdU	FSC/SSC	BrdU	FSC/SSC
a				x						x		s
c	x					s	n.d.	n.d.				s
d		x				s	n.d.	n.d.				s
e	x						x			x		
f	x		x							x		
g												s
h												s
I							x					
k	x					s	x					
l	x					s	x					
m						s	x					
n	x											
p						s	x			x		
q											x	s
r	x					s	x					s
s	x	x										
t	x									x		s
v		x	x		x	s		x				s
w	n.d.	n.d.			x	s						
y	n.d.	n.d.										

* Experiment 3. Effekte der Peptidgemische von Deca-Bank PCL 99-1 und der Nona-Banken PCL 97-3 und TPI-921 auf die TZL des Patienten B, aufgrund der bekannten Aminosäure und der Position an der sich diese in dem Nona- bzw. Deca-Peptid befindet.

Auswertung durch BrdU⁺ bzw. FSC/SSC-Analyse.

x = Inhibition von 15 % verglichen zur Negativkontrolle

s = Stimulation von 15 % verglichen zur Negativkontrolle

n.d. = nicht determiniert (z.B. Rohdaten, die bei der Auswertung entweder aufgrund einer zu geringer Zellzahl oder aufgrund einer Inkonsistenz zwischen den Duplikaten aussortiert wurden)

4.4.3 Zusammenfassung der Experimente mit kombinatorischen Peptidbibliotheken

Die Peptidgemische der drei getesteten Bibliotheken scheinen Aminosäure-spezifische Effekte auf die polygene Population der T-Zellen auszuüben. Die einzelnen Peptidgemische zeigten dabei ein variables Inhibitions- bzw. Stimulationsmuster, welches im Wesentlichen spezifisch auf die jeweiligen Mixturen zurückzuführen ist, da in ihrer Abwesenheit keine solchen Effekte beobachtet wurden. Teilweise konnte außerdem eine Übereinstimmung zwischen den einzelnen Bibliotheken untereinander beobachtet werden, wobei die Deca-Bibliothek PCL 99-1 die geringste Wirkung auf die polyklonalen TZL ausübte. Auffällig war außerdem, dass durch die FACS-Analysen der BrdU⁺ Zellen durchweg inhibitorische Effekte der Peptidgemische zu

verzeichnen waren, wohingegen bei der FSC/SSC-Analyse auch stimulierende Effekte festgestellt wurden. Es lassen sich also, im Gegensatz zu der isoliert betrachteten Lymphoblastenpopulation, in der Gesamt-T-Zell-Population noch Zellen aktivieren. Weiterhin besteht eine Korrelation zwischen der FSC/SSC-Analyse und der BrdU-Analyse (siehe Plot 2 in Abbildung 9B).

Wie erwartet sind die Effekte, welche die einzelnen Aminosäuren, die sich an definierter Position der Peptide der unterschiedlichen Peptidbibliotheken befinden, auf die polyklonalen TZL nicht so ausgeprägt, wie bei der Verwendung klonaler T-Zell-Populationen. Wir konnten jedoch zeigen, dass die Peptidbibliotheken auch messbare Effekte auf T-Zell-Linien zu besitzen scheinen, was zu dem Schluss führt, dass kombinatorische Peptidbibliotheken prinzipiell dafür geeignet sind, die Spezifität von T-Zellen aus psoriatischen Plaques zu ermitteln. Um die biologische Relevanz der beschriebenen Ergebnisse beurteilen zu können, bedarf es allerdings noch weiterer experimenteller Studien.

5 Diskussion

5.1 Identifizierung pathogenetisch relevanter T-Zellen

Eine Möglichkeit zur Identifizierung pathogenetisch relevanter Antigene bei der Psoriasis-Pathogenese, ist die Determinierung der TZR-Spezifität durch den Einsatz kombinatorischer Peptidbibliotheken (114). Die Validität dieser Herangehensweise beruht dabei im Wesentlichen auf der Möglichkeit T-Zell-Klone zu isolieren, die pathogenetisch relevant sind. Es konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass Patienten mit aktiver Psoriasis eine erhöhte Anzahl von T-Zellen innerhalb der läsionalen Plaques besitzen, welche die α -Kette des IL-2-Rezeptors exprimieren (CD25), einen Marker für aktivierte Zellen (45, 75). Für die Bedeutung CD25⁺ T-Zellen bei der Psoriasis-Pathogenese sprechen des Weiteren, dass erstens eine systemische Therapie mit IL-2 Diphtherie-Toxin, welches selektiv CD25 exprimierende T-Zellen beseitigt, bei etwa 40% der Patienten mit schwerer Psoriasis therapeutisch sehr effektiv eingesetzt werden konnte (54), dass zweitens, verglichen mit T-Zellen aus peripherem Blut, ein höherer Anteil läsionärer T-Zellen aus den Plaques CD25 exprimiert (50), drittens die primäre Veränderung psoriatischen Blutes in einer Zunahme des prozentualen Anteiles von CD25 und CD3 exprimierenden T-Zellen besteht (34,77) und zuletzt, dass das IL-2- Rezeptor Level im peripherem Blut mit der Aktivität der Erkrankung korreliert (35). Hinzufügen lassen sich zu diesen Beobachtungen nun die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten, welche eine hohe Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung, ausgedrückt als PASI-Index, und der Häufigkeit von CD25⁺CD3⁺ T-Zellen in psoriatischen Plaques aufweist. Unsere zusätzliche Feststellung, dass erwartungsgemäß eine starke Korrelation zwischen der CD4⁺ und CD4⁺ CD25⁺-Subpopulation, als auch zwischen der CD8⁺ und CD8⁺ CD25⁺-Subpopulation besteht, unterstützt weiterhin die Annahme, dass die Subpopulation, welche am meisten expandiert ist, auch die Mehrheit der CD25⁺-Fraktion in einem psoriatischem Plaque darstellt. Zusammengefasst unterstützen die verfügbaren Daten die Hypothese einer persistierenden T-Zell-Aktivierung bei der Psoriasis. Offensichtlich sind aktivierte (CD25⁺) T-Zellen in der Psoriasis-Pathogenese involviert. Daher liegt die Vermutung nahe, dass CD25⁺ T-Zellen als pathogenetisch relevante Klone bei Psoriasis auftreten und damit zur Determinierung der Rezeptor-Spezifität geeignet sind.

5.2 T-Zell-Subpopulationen bei der Psoriasis

Obwohl eine zentrale Rolle der T-Lymphozyten in der Pathogenese der Psoriasis allgemein akzeptiert ist, bestehen Unstimmigkeiten darüber, ob es sich bei den T-Zellen, welche die Krankheit verursachen, um $CD8^+$ oder $CD4^+$ T-Zell-Untereinheiten handelt (7, 98, 120). Weiterhin werden die potentiellen Funktionen der läsionalen $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen in psoriatischen Plaques kontrovers diskutiert. So wird teilweise davon ausgegangen, dass $CD4^+$ T-Zellen die pathogenetisch relevanten Effektoren darstellen, alleine schon wegen der erfolgreichen systemischen Behandlung auch schwerer Psoriasisfälle, mit monoklonalen CD4-Antikörpern (54, 96), wohingegen $CD8^+$ T-Zellen eher als Krankheitssuppressoren zu fungieren scheinen (23). Nach anderer Auffassung wiederum wird eher den $CD8^+$ T-Zellen eine wichtige Effektor-Rolle in der Krankheitspathogenese der Psoriasis zugeschrieben (53). Die Prädominanz von T1-Zytokinen, deren Produktion sowohl durch die $CD4^+$ als auch durch die $CD8^+$ Untereinheiten der epidermalen T-Zellen ausgelöst werden kann (8), spricht für eine Rolle von $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen als T1 –Effektoren.

5.2.1 Immunophänotypische Studien

Immunodermatologen richten ihr Augenmerk auch deswegen auf $CD8^+$ T-Zellen, da diese Peptide erkennen können, die durch antigen-präsentierende Zellen (APC) im Kontext von Klasse I MHC Zell-Oberflächenmolekülen präsentiert werden (151) und die Psoriasis mit dem HLA-Klasse I Antigen Cw6 assoziiert ist (71, 158). Eine Reihe immunophänotypischer Studien stellten eine Präsenz $CD8^+$ T-Zellen in der Epidermis fest, wohingegen $CD4^+$ T-Zellen in der Dermis zu prädominieren scheinen (45). Bereits in nur drei Tage alten psoriatischen Läsionen beginnen $CD8^+$ T-Zellen in der Epidermis zu akkumulieren (62). Weiterhin sprechen folgende Beobachtungen für einen aktiven Beitrag von $CD8^+$ T- Zellen bei der Pathogenese der Psoriasis:

1. Die Prädominanz von $CD8^+$ T- Zellen und die Assoziation mit primär Klasse I-Allelen in psoriatischer Arthritis (33).
2. Die heftige Exazerbation von Psoriasis im Rahmen einer fortgeschrittenen HIV-Infektion, trotz der Depletion $CD4^+$ T-Zellen (85).
3. Der schnellere und selektive Rückgang $CD8^+$ T-Zellen bei erfolgreicher UVB-Therapie (75)
4. Die statistisch signifikante Reduktion der intraepidermalen $CD8^+$ T-Zell-Populationen nach erfolgreicher immunspezifischer Therapie (54).

Vor dem Hintergrund dieser vielfältigen Beobachtungen ist es erstaunlich, dass in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass von T-Zell-Kulturen, die aus peripherem Blut gewonnen wurden, nur die CD4⁺T-Zell-Linien, nicht aber CD8⁺ T-Zell-Linien in der Lage waren, symptomlose Haut unter Verwendung des SCID-Maus-Modells in psoriatische Plaques umzuwandeln (97).

5.2.2 Funktionelle Interaktion zwischen CD4 und CD8 T- Zellen

Experimentell ermittelte Daten deuten zusammengenommen darauf hin, dass sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺ T-Zellen zu einer Manifestation und/ oder Aufrechterhaltung psoriatischer Plaques beitragen können (107). Es wurde beobachtet, dass Koebner-Phänomen-initiierte psoriatische Läsionen, sowie die spontane Eruption neuer psoriatischer Läsionen mit der Migration von CD4⁺ T-Zellen in die Epidermis assoziiert sind. Diese Migration geht allerdings mit einer progressiven Reduktion dieser T-Zell-Untereinheiten bei der Entwicklung von Plaques einher (12), wohingegen die Rekrutierung aktivierter CD8⁺ T-Zellen mit der Zunahme der psoriatischen Hautveränderungen ansteigt (11). Eine mögliche Interpretation dafür wäre, auch unter dem Gesichtspunkt der Beobachtungen aus den Versuchen mit den SCID-Mäusen, dass CD4⁺ T-Zellen den Krankheitsprozess einleiten (99). Dies geschieht wahrscheinlich, indem die prä-aktivierten CD4⁺ T-Zellen die notwendigen Signale bereitstellen für die ‚Präkonditionierung‘ der dendritischen Zellen, welche dann wiederum die Effektor-Funktion der zytotoxischen T-Zellen erhöhen (137). Aus diesem Grund könnte die primäre Aufgabe der CD4⁺ T-Zellen bei der Entwicklung psoriatischer Plaques darin bestehen, diese Effektor-Funktion der zytotoxischen T-Lymphozyten zu verstärken.

Da gegenwärtig davon ausgegangen wird, dass eine gesteigerte Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten durch CD4⁺ T-Zellen induziert wird, die durch dendritische Zellen vermittelt wird (16), ist es wahrscheinlich, dass die CD8⁺ T-Zellen damit als eigentliche Effektorzellen fungieren (53). Dies geschieht vermutlich über eine Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen und/ oder Keratinozyten durch Zell-zu-Zell Kontakte oder über lösliche Faktoren (107). Eine funktionelle Interaktion zwischen beiden T-Zell-Untereinheiten mit einer Abhängigkeit der CD8⁺ T-Zellen von CD4⁺ T- Zellen erscheint somit als wahrscheinlich.

5.3 Beziehung zwischen Krankheitsstatus und T-Zell Phänotyp-Verteilung bei Psoriasis

Vorangegangene Studien beobachteten die Präsenz $CD25^+CD8^+$ Zellen in der Epidermis unbehandelter psoriatischer Plaques (7). Weiterhin wurde kürzlich von einer Studie berichtet, die eine Korrelation zwischen der Häufigkeitsverteilung zirkulierender $CD25^+CD8^+$ T-Zellen und dem PASI-Score von Patienten mit verhältnismäßig schwerer Psoriasis ($PASI > 10$) feststellten. Eine Korrelation zwischen PASI-Score und der Frequenz $CD25^+CD4^+$ T-Zellen wurde hingegen nicht beobachtet (140). Die im Rahmen unserer Arbeit ermittelten Ergebnisse unterstützen diese Ergebnisse. Sie weisen zusätzlich zu der beobachteten Korrelation von Krankheitsaktivität und $CD3^+CD25^+$ T-Zellen eine starke Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der Häufigkeitsverteilung der $CD25^+CD8^+$ T-Zellen auf, die aus psoriatischen Plaques emigriert sind, und zwar trotz der insgesamt höheren Anzahl $CD4^+$ T-Zellen. Hierbei wurden allerdings nicht nur die Patienten mit einem PASI-Score > 10 beurteilt, sondern alle Patienten von denen eine Hautprobe entnommen wurde (PASI 6-34). Diese Beobachtungen lassen sich gut mit der Vorstellung vereinbaren, dass die $CD8^+$ T-Zellen eine wichtige Rolle in Bezug auf die Krankheitsaktivität spielen könnten. $CD25^+CD4^+$ T-Zellen und Krankheitsaktivität korrelierten negativ miteinander.

In kürzlich durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass murine $CD25^+CD4^+$ T-Zellen als Schlüssel-Regulatoren im Sinne einer Suppression autoreaktiver Immunantworten fungieren (6). Dabei liess sich durch Thymektomie am dritten Tag postpartal eine multiorgane Autoimmunerkrankung (Gastritis, Thyroiditis, Insulinitis) auslösen, die assoziiert war mit dem Verlust $CD25^+CD4^+$ T-Zellen (73). Auch andere Studien beobachteten die immunregulatorisch bedeutsame Potenz derartiger T-Zellen in Ratten (89), was für eine Spezies-übergreifende Rolle $CD25^+CD4^+$ T-Zellen spricht. Eine weitere Studie berichtet über $CD25^+CD4^+$ Populationen regulatorischer T-Zellen im menschlichen Kreislauf, die funktionell praktische identische Charakteristika besitzen, wie die aus der Maus isolierten regulatorischen $CD25^+CD4^+$ T-Zellen (9). Diese Beobachtungen könnten erklären, weshalb die bei unseren Ergebnissen festgestellte Negativkorrelation zwischen $CD25^+CD4^+$ T-Zellen aus psoriatischen Plaques und dem Schweregrad der Erkrankung besteht. Es könnte demnach sein, dass $CD25^+CD4^+$ T-Zellen eine regulatorische Rolle in einem möglichen Autoimmungeschehen der Psoriasis einnehmen.

5.4 Effekte der *in vitro*-Kultivierung auf T-Zellen aus psoriatischen Plaques

Dass die Kultivierung von T-Zellen *in vitro* im Vergleich zur *in vivo* Situation potentiell artifizielle Effekte beinhaltet, ist ein grosser Nachteil dieser Studien. Dennoch tragen sie, bei kritischer Würdigung dieser Einschränkung, viel für das Verständnis gewisser *in vivo* Prozesse bei. *In vivo* Studien zeigen, dass die normale Dermis in etwa die gleiche Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen enthält, wohingegen die normale Epidermis zum größten Teil aus CD3⁺/CD8⁺T-Zellen besteht (24). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu *in vitro*-Experimenten, in denen dermale T-Zell-Linien hauptsächlich aus CD3⁺/CD8⁺T-Zellen bestehen und, die auf exakt die gleiche Weise expandierten epidermalen T-Zell-Linien, zu 60% aus CD3⁺/CD4⁺T-Zellen bestehen (146). Der Grund für diese Diskrepanz ist nicht bekannt.

Wir konnten beobachten, dass die Menge der T-Zellen, die während einer Woche aus psoriatischen Plaques emigriert waren, nahezu doppelt so viele CD4⁺T-Zellen, im Vergleich zu CD8⁺T-Zellen enthielten, diese Verteilung sich aber nach längerer Kultivierung und Expandierung der T-Zellen *in vitro* umkehrte. Ob die Umkehr der CD4⁺/CD8⁺-Ratio an unseren Kulturbedingungen oder an anderen Parametern lag, welche die Proliferation von bevorzugt CD8⁺ T-Zellen unter längeren Kulturbedingungen stimulieren, bzw, die der CD4⁺ T-Zellen inhibieren, konnte bisher nicht geklärt werden, stellt aber eine interessante Beobachtung dar, die in weiteren Studien genauer untersucht werden müsste.

In normaler Haut besteht eine geringe Subpopulation humaner $\alpha\beta^+$ epidermaler T-Zellen aus CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (sog. „doppelt negative“, DN) T-Zellen (55). Der $\gamma\delta$ TZR wird von 1% bis 15% der epidermalen T-Zellen exprimiert (56), wobei davon die meisten aus DN T-Zellen bestehen (38). Wir stellten eine beträchtliche Akkumulation in den über längere Zeit expandierten TZL fest. Zukünftige Studien sind notwendig, um die Natur dieser Population aufzuklären. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Klonierung von T-Zellen aus vorher expandierten TZL zu einer Population von T-Zell-Klonen führen kann, die eine unnatürliche phänotypische Verteilung aufweisen und dass die Fokussierung auf CD8⁺ T-Zell-Klone eine gerechtfertigte Herangehensweise zur Determinierung der TZR-Spezifität in zukünftigen Studien darstellt.

5.5 Klonierung und Expansion von T- Zellen aus psoriatischen Plaques

Techniken zur Generierung und Kultivierung humaner T-Zell-Klone wurden bereits vor über zwanzig Jahren vorgestellt (110). Allerdings musste man schnell feststellen, dass diese Zellen sich *in vitro* nicht uneingeschränkt vermehren. Auch wenn T-Zellen sich in Gewebekulturen über einen längeren Zeitraum kultivieren lassen, zeigten diese in den meisten Studien eine sehr begrenzte Lebenserwartung (39, 58). Quantitative Studien über Klonierungseffizienzen wurden bisher kaum durchgeführt (109). Da T-Zell-Klone aus psoriatischen Plaques bereits in der Vergangenheit isoliert wurden, evaluierten wir Faktoren, welche die Klonierung und Expansion der T-Zellen beeinflussen, um Genaueres über pathogenetisch relevante T-Zellen bei Psoriasis zu erfahren. Da gezeigt worden war, dass in SCID-Maus-Modellen psoriatische Läsionen durch Injektion von T-Zellen aus psoriatischer Haut induziert werden konnten, wenn ein Antigen-Cocktail diese aktivierte, nicht aber durch T-Zellen aus dem Blut von Psoriatikern (141), beschränkten wir uns ausschliesslich auf die Klonierung von T-Zellen aus inflammatorischen psoriatischen Plaques, um eine möglichst repräsentative Population von pathogenetisch relevanten T-Zell-Klonen zu erhalten.

Nachdem wir eine Umkehr der CD4⁺/CD8⁺ Phänotyp-Verteilung der TZL beobachten konnten, welche über einen längeren Zeitraum vor der Klonierung expandiert wurden und sich eine forcierte Isolation von T- Zellen sofort nach Biopsieentnahme als schädlich für die Zellen herausstellte, etablierten wir ein Protokoll, in dem die Zellen nach Biopsieentnahme nur für kurze Zeit emigrieren sollten, um dann via CD25⁺-Selektion sortiert zu werden. Diese Vorgehensweise stellte sich als ein sehr verlässliches Verfahren heraus. Von allen getesteten Patienten wurden hoch gereinigte CD25⁺ T-Zell-Fractionen gewonnen, welche anschließend für die Klonierung eingesetzt werden konnten. Die Experimente, welche dann anschließend mittels 'limiting dilution' durchgeführt wurden, zeigten, dass ein Wachstum von Klonen auch in der Abwesenheit von spezifischen Stimulatoren wie α CD3, PHA oder der Peptidbanken zu verzeichnen war, was die Vermutung nahe legt, dass ein klonales Wachstum in diesem Fall nicht nur von der TZR- Aktivierung der sortierten CD25⁺-Population abhängig ist.

Die Etablierung von TZL und Klonen, die mit einem Selbst-Antigen reagieren, ist nicht so problemlos durchführbar, wie die Etablierung von denjenigen, die auf ein Fremd-Antigen ansprechen (152). Da wir in unserem Fall nicht davon ausgehen können, dass es sich um ein Fremd-Antigen handelt, könnte dieser Fakt dafür sprechen, dass die Schwierigkeiten im Zusammenhang mit der Klonierung und Expandierung unserer T-Zellen eventuell dadurch bedingt sind, dass es sich um eine Reaktion mit (einem) Auto- Antigen(en) handelt. Dies wäre

möglicherweise dadurch zu erklären, dass die Immun-Toleranz gegenüber einem Auto-Antigen hauptsächlich bestimmt wird durch die klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus in einem frühem Stadium der Entwicklung der T-Lymphozyten, indem die meisten T-Zellen, die ein Selbst-Peptid erkennen, den TZR-Liganden nicht unbedingt mit einer hohen Affinität binden (68) und diese T-Zellen einem aktivierungsinduziertem Zelltod *in vivo* unterliegen (147)

5.5.1 Verwendung von Apoptoseinhibitoren zur *in vitro*-Expansion von T-Zell-Klonen

Der sog. aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD) stellt eine apoptotische Signalkaskade zur Kontrolle der T-Zell-Homöostase dar, indem das uneingeschränkte Wachstum aktivierter T-Zellen *in vivo* via Apoptose limitiert wird (95, 124, 162). Die zahlenmäßige Limitierung massiv expandierter aktivierter T-Zellen ist wichtig für die Wiederherstellung einer angemessenen Anzahl von T-Zellen im Organismus um Zellen zu beseitigen, die ansonsten die Sekretion zytotoxischer Zytokine fortsetzen würden und um das Potential kreuz-reagierender Autoimmunschäden zu reduzieren (87). Die Proliferation von CD25⁺ T-Zell-Klonen könnte durch AICD beeinträchtigt sein. Die große Mehrheit von Lymphozyten, die durch antigen-spezifische Aktivierung generiert wurden, werden auf diese Weise wieder eliminiert (124). IL-2- und IL-2-Rezeptor- α -Kette (IL-2R α chain, CD25)- defiziente Mäuse entwickeln Lymphadenopathien und Autoimmunerkrankungen aufgrund eines Mangels von AICD *in vivo* (133), was dafür spricht, dass diese Art des Zelltodes bei aktivierten T-Zellen von Bedeutung ist.

Da durch viele Studien gezeigt werden konnte, dass eine Fas/FasL-Interaktion der Auslösung des apoptotischen Zelltodes aktivierter T-Zellen zugrunde liegt (142) und aufgrund der Annahme, dass Apoptose bei der Proliferationsfähigkeit unserer CD25⁺ T-Zellen eine Rolle spielen könnte, untersuchten wir den Effekt einer Blockierung der Fas/FasL-Interaktion und/oder die Wirkung des Caspase-3 Inhibitors DEVD-CHO auf das klonale Wachstum der T-Zellen. Während bei Klonen geringer proliferativer Aktivität kein Effekt durch die Apoptosehemmer beobachtet werden konnte, zeigten die T-Zellen mit hoher proliferativer Aktivität hingegen, sowohl bei dem Einsatz von nur einem Apoptosehemmer als auch synergistisch in Kombination, eine verminderte Apoptoserate, die anhand der Annexin-V-Oberflächenexpression gemessen wurde. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Apoptose bevorzugt die Expansion von psoriatischen Zellen mit einer hohen Proliferationsrate limitiert. Diese Beobachtung wird unterstützt durch den Befund, dass Fas zwar auch in ruhenden T-Zellen exprimiert wird, eine Aktivierung aber die Fas-Expression erhöht und die Zellen so sensitiviert werden für einen Zelltod via Fas (124). Stark oder wiederholt stimulierte T-Zellen regulieren FasL hoch und

begehen Selbstmord oder lösen sich via Fas auf (74). AICD durch erhöhte Fas-Expression kann bei T-Zellen durch Behandlung mit IL-2 zusätzlich gesteigert werden (125). Andererseits sind nicht alle Zellen, welche den Fas-Rezeptor exprimieren, empfänglich für einen Fas-medierten Tod. Die Konversion einer T-Zelle von einem resistenten Phänotyp hin zu einem sensitiven Phänotyp benötigt mindestens zwei Faktoren: IL-2-Vorbehandlung und einen bestimmten Aktivierungs-Stimulus, wie z.B. α CD3-Antikörper (95).

Auch der Metabolismus reaktiver Sauerstoff-Radikale vermag es einen programmierten Zelltod auszulösen (29, 67). Dieser Weg könnte eine mögliche Erklärung liefern, für die in vielen Studien gezeigte und auch von uns gemachte Beobachtung, dass eine Caspase-Inhibition nicht immer zu einer Blockierung des Zelltodes führt (148). In diesem Fall stellt die Caspase-Aktivierung nur ein sekundäres Ereignis dar, welches von ROS kontrolliert und zwar für die DNA-Degradierung benötigt wird, aber nicht den eigentlichen Zelltod auslöst. Dabei wird jedoch durch ROS zusätzlich der Verlust des mitochondrialen transmembranen Potentials ($\Delta\psi_m$) und der apoptotische Zelltod kontrolliert (67). Das aus diesem Grund von uns eingesetzte Anti-Oxidans MnTBAP (manganese [III] tetrakis [5,10, 15, 20-benzoic acid] porphyrin), welches den Verlust des $\Delta\psi_m$ und die DNA-Degradierung verhindern soll (67), zeigte allerdings in unseren Experimenten keine vorteilhaften Effekte in Bezug auf die T-Zellexpansion.

Die Etablierung und Expandierung der T-Zell-Klone aus psoriatischen Plaques stellte sich insgesamt als sehr schwierig heraus. T-Zell-Klone reagieren deutlich empfindlicher auf Änderungen der Kulturbedingungen (109), was die Schwierigkeiten erklären könnte, die wir und auch andere Labore, bei dem Versuch T-Zell-Klone für eine längere Zeit am Leben zu halten, erfahren mussten. Ob nun suboptimale Kulturbedingungen für die Komplikationen der Etablierung und Expandierung der T-Zellen verantwortlich sind oder andere Faktoren, wie zum Beispiel ein Verlust der Lymphozyten an DNA-Telomeren *in vitro* (168), ist bisher nicht bekannt und muß in zukünftigen Studien geklärt werden.

5.6 Einsatz kombinatorischer Peptidbibliotheken an polyklonalen T-Zell-Linien

Die Identifizierung spezifischer T-Zell-Antigene ist von großer Wichtigkeit für das Verständnis und die Therapie infektiöser Erkrankungen und Autoimmunstörungen (143). Auch bei der Psoriasis stellt sich die Frage nach dem Mechanismus, der zu einer Aktivierung der T-Zellen in der Haut von Psoriatikern führt. Die Analyse der TZR-Spezifität in entzündlichen Infiltraten würde dabei einen näheren Aufschluss über den auslösenden Stimulus erlauben. Die

Entwicklung kombinatorischer Peptidbibliotheken, stellte sich als eine sehr überzeugende Methode für die Determinierung von T-Zell-Epitopen und der Analyse der TZR-Spezifität und Flexibilität heraus (114). Kürzlich durchgeführte Studien mit T-Zell-Klonen zeigten die Effektivität von PS-SCL für die Identifizierung von Ziel-Antigenen und hoch aktiven Peptid-Imitatoren (60, 61, 65, 160, 170). Die Identifizierung der Epitope von klonalen TZR bekannter oder unbekannter Spezifität wird dadurch möglich, indem man eine Strategie verwendet, welche die aus der PS-SCL erhaltenen Daten und die Analysen aus einer quantitativen Scoring-Matrix miteinander kombiniert (63, 175). Unseres Wissens ist diese Strategie die effizienteste Herangehensweise um stimulatorische Peptide für individuelle TZR zu identifizieren und ihre aktuelle stimulatorische Potenz mit relativ hoher Genauigkeit vorherzusagen (175). Außerdem bietet sie sich aufgrund der Unklarheit über den auslösenden T-Zell-Stimulus bei Psoriasis als eine besonders attraktive Methode an, um die TZR-Spezifität von T-Zellen aus psoriatischen Plaques zu analysieren.

5.6.1 Messung der peptid-stimulierten Proliferation polyklonaler T-Zellen

Bei dem bisherigen Einsatz von PS-SCL bestand der hauptsächlichste Unterschied zwischen dem Studium von CD4⁺T-Zellen und CD8⁺T-Zellen in dem Assay, der für das Screening der PS-SCL auf die biologische Aktivität der Zellen verwendet wurde. Das Ausmaß der CD8⁺T-Zell-Aktivierung wird über die Freisetzung von ⁵¹Cr (⁵¹Chrom) oder anderen fluoreszenzbasierten Assays beurteilt, welche die Zytotoxizität messen. Die Aktivierung der CD4⁺T-Zellen hingegen wird durch einen Proliferationsassay bestimmt, der den Einbau von [³H]Thymidin (³H-TdR) in neu synthetisierte DNA über Szintillations-Zählung misst (143, 20).

Die Quantifizierung der Zellaktivität ist von besonderer Wichtigkeit, um die proliferative Antwort der Zellen auf die einzelnen Peptidgemische beurteilen zu können. Bei der Testung solcher komplexer Gemische, die sich aus PS-SCL zusammensetzen, ist es essentiell, die Bedingungen des zum Screening verwendeten Assays zu optimieren, um das höchste Niveau der Sensitivität und Reproduzierbarkeit zu erlangen und um erfolgreich die am stärksten aktiven Gemische auszuwählen. Der verwendete Proliferationsassay muß zuverlässig, reproduzierbar, sowie zeit- und arbeitssparend sein.

Die Proliferation von Zellen auf die Reaktion verschiedener Stimuli wurde bisher üblicherweise über die Aufnahme radioaktiv markierter Nukleotide, wie ³H-TdR (84) oder Uridin Desoxyriboside (³H-UdR) beurteilt (49). Diese radiomarkierten Methoden haben mehrere Nachteile. Dazu zählt die Verwendung von Radioisotopen, der Bedarf an spezialisierter und

teurer Laborausstattung wie Szintillationszähler und das damit assoziierte Risiko durch die toxische Szintillationsflüssigkeit (83). Außerdem gibt eine Messung durch den ^3H -TdR-Assay nur Auskunft darüber, wieviele Zellen insgesamt proliferiert sind. Unklar bleibt, welche phänotypischen T-Zell-Untereinheiten aufgrund des *in vitro* Stimulus proliferiert sind. Eine Alternative zu ^3H -TdR stellt die Bestimmung des Einbaus von 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) in neu synthetisierte DNA dar (88). Bei Mäusen wurde die Markierung von Zellen mit BrdU für die Studie von B- und T-Lymphozyten eingesetzt (134). In einer Studie an Ratten stellte sich heraus, dass der BrdU-ELISA, verglichen mit anderen nicht-radiomarkierten Proliferations-Assays, bei der Proliferations-Bestimmung von CD4^+ Zellen die höchste Sensitivität besitzt und der bevorzugte Assay ist, wenn nur wenig Veränderungen im Zellwachstum erwartet werden (83).

Die Immunfluoreszenz-Färbung von inkorporiertem BrdU mit anschließender FACS-Analyse stellt eine hohe Auflösungs-Technik dar, um die Häufigkeitsverteilung und die Natur individueller DNA-synthetisierender Zellen zu bestimmen. Bei dieser Methode wird BrdU, ein Pyrimidinanalogon, anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA von Zellen eingebaut, die in die S-Phase (DNA-Synthese-Phase) des Zell-Zyklus eintreten bzw. im Teilungszyklus weiter fortschreiten (92). Das inkorporierte BrdU wird mit spezifischen anti-BrdU Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt und der Anteil des Zell-assoziierten BrdU durch FACS-Analyse bestimmt (siehe Material und Methoden).

Durch den erstmaligen Einsatz dieser Methode zum Screening der kombinatorischen Peptidbibliotheken ergaben sich für uns eine Reihe von Vorteilen. Die Kombination von BrdU-Inkorporation und anschließender FACS-Analyse ermöglichte uns in einem unkomplizierten und präzisen Verfahren, die simultane Determinierung der Expression bestimmter Oberflächenmarker und des Aktivierungszustands der polyklonalen Zell-Linien ohne zusätzliche Versuchsdurchgänge. Wir konnten zeigen, dass es mit dieser Methode möglich ist, den Effekt der Peptidbibliotheken auf die polyklonalen T-Zell-Linien miteinander zu vergleichen. Insbesondere eröffnete es die zusätzliche Möglichkeit, die phänotypische Verteilung der T-Zell-Populationen zu beurteilen und dadurch eine Aussage darüber treffen zu können, welche Zellen besonders stark auf die einzelnen Peptidgemische reagiert haben. Möglicherweise wäre dies also ein wichtiger Schritt zu einem besseren Verständnis in der Psoriasis-Pathogenese. Sollte sich der Einsatz des CD25-Assays als eine zuverlässige und valide Methode herausstellen, würde dies eine sogar noch stärkere Vereinfachung der Versuchsdurchführung bedeuten, da der zeitliche Aufwand dieses Assays im Vergleich zu dem BrdU-Assay erheblich geringer ist.

5.6.2 Expandierung polyklonaler T-Zell-Linien

Die Entschlüsselung der Spezifität von T-Zellen wurde durch die Einführung der T-Zell-Klonierung durch sog. ‚limiting dilution‘ und andere Techniken stark vereinfacht. Weiterhin ergab sich durch die kontinuierliche Expansion von T-Zell-Klonen durch wiederholte Antigen-Stimulation und lösliche Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise IL-2 eine weitere Vereinfachung. Wenn die Zellen klonal vorhanden sind und zu einer ausreichenden Anzahl expandiert werden können, ist es möglich, deren TZR auf ihre Spezifität mit PS-SCL oder anderen Methoden zu testen. Allerdings sind T-Zellen unbekannter Spezifität weder leicht zu klonieren noch leicht zu expandieren (90).

Die Effizienz der Klonierung und Expandierung von monoklonalen T-Zellen aus psoriatischen Plaques, stellte sich auch bei unseren Experimenten als der limitierende Faktor heraus. Aufgrund dieser Problematik expandierten wir polyklonale T-Zell-Linien aus psoriatischen Plaques was sich als eine erheblich einfachere und effektivere Methode herausstellte. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das T-Zell-Infiltrat chronischer psoriatischer Plaques hochgradig repetitive V β -TZR-Rearrangements enthält und durch klonal expandierte T-Zell-Populationen charakterisiert ist (31, 91). Diese lassen sich noch in späteren Biopsien nach mehreren Jahren und von unterschiedlich entnommenen Lokalisationen nachweisen (164). Die klonale Dominanz eindeutig läsionaler TZR-Rearrangements innerhalb einer deutlich erhöhten Anzahl von T-Zellen in inflammatorischen psoriatischen Plaques legt die Vermutung nahe, dass eine Testung der TZR-Spezifität polyklonaler TZL aus diesen Plaques ähnlich aufschlussreich und aussagekräftig sein könnte wie die Testung von T-Zell-Klonen.

5.6.3 Effekte der Peptidbibliotheken auf polyklonale T-Zell-Linien

Bisher war der Einsatz kombinatorischer Peptidbibliotheken im positional scanning Format auf die Testung von TZR-Spezifitäten klonaler T-Zellen beschränkt. Erstmals versuchten wir, polyklonale T-Zell-Linien in Kombination mit PS-SCL einzusetzen. Dabei konnten wir zeigen, dass die Peptidgemische überhaupt einen messbaren Effekt auf die polyklonale Population besitzen. Die einzelnen Peptidgemische zeigten ein variables Inhibitions-, bzw. Stimulationsmuster, welches spezifisch auf die jeweiligen Sub-Bibliotheken zurückzuführen ist, da in ihrer Abwesenheit keine solchen Effekte beobachtet wurden. Teilweise konnte außerdem eine Übereinstimmung zwischen den einzelnen Bibliotheken untereinander beobachtet werden,

wobei die Deca-Bibliothek PCL 99-1 insgesamt die geringste Wirkung auf die polyklonalen TZL ausübte. CD4⁺T-Zellen erkennen längere Peptide in Assoziation mit MHC-Klasse II, wohingegen CD8⁺T-Zellen typischerweise nur 8-10 Aminosäure-lange Peptide im Kontext von MHC-Klasse I-Molekülen wahrnehmen, und längere Peptide durch die geschlossene Bindungsgrube an einer Bindung gehindert werden (20, 114, 143). Aus diesem Grund werden weniger komplexe Peptidbibliotheken bei der Determinierung MHC-Klasse I beschränkter Spezifität, also CD8⁺T-Zellen, eingesetzt (114) und Deca-Bibliotheken eher für die Identifizierung der TZR-Spezifität von CD4⁺T-Zellen. Die stärkeren Effekte der Nona-Bibliotheken in unserem Fall könnten demnach dafür sprechen, dass es sich bei den Zellen, die am stärksten auf die Peptidgemische reagieren, hauptsächlich um CD8⁺T-Zellen handelt. Betrachtet man allerdings die FACS-Analysen der drei einzelnen Experimente, ist dies allerdings nicht zwingend der Fall, da die Effekte unter anderem auch stärker auf die Population der CD4⁺T-Zellen sind. Auffällig war zudem, dass in der BrdU⁺ Analyse durchweg inhibitorische Effekte der Peptidgemische zu verzeichnen waren, wohingegen bei der FSC/SSC-Analyse auch stimulierende Effekte festgestellt wurden. Im Gegensatz zu der isoliert betrachteten Lymphblastenpopulation, lassen sich also von allen T-Zellen insgesamt noch Zellen aktivieren,

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir eine starke Korrelation zwischen dem Schweregrad der Psoriasis und der Häufigkeit von CD3⁺CD25⁺ T-Zellen in psoriatischen Plaques aufdecken konnten und eine noch stärkere zwischen CD25⁺CD8⁺ T-Zellen und der Krankheitsaktivität. Weiterhin stellte sich heraus, dass prolongierte *in vitro*-Kultivierung die phänotypische Verteilung von T-Zell-Linien verändert und dass durch eine Sortierung von CD25⁺T-Zellen, die nur kurze Zeit aus psoriatischen Plaques emigriert sind, hochgereinigte CD25⁺-Fraktionen isoliert werden können. Wir entwickelten eine Methode, die es ermöglicht, CD25⁺ T- Zellklone ohne eine vorherige Expansion von T- Zell- Linien *in vitro* zu isolieren und zu expandieren. Außerdem konnten wir zeigen, dass eine Blockierung der Apoptose die Proliferation aktivierter T-Zell-Klone *in vitro* verbessern kann.

6 Zusammenfassung

Die Bedeutung von T-Zellen bei der Pathogenese der Psoriasis ist allgemein anerkannt. Trotz der Erkenntnis, dass die T-Zell-Aktivierung eine Schlüsselrolle in der Krankheitspathogenese spielt, ist nicht bekannt, wodurch diese Aktivierung ausgelöst wird. Um Näheres über den unbekanntem T-Zell-Stimulus zu erfahren, bietet es sich an, die T-Zell-Rezeptor-Spezifität der Lymphozyten in entzündlichen Infiltraten zu analysieren. Die Determinierung der TZR-Spezifität von T-Zell-Klonen durch den Einsatz kombinatorischer Peptid-Bibliotheken wäre hierfür ein möglicher experimenteller Zugang. Die Validität dieser Herangehensweise setzt allerdings die Möglichkeit voraus, pathogenetisch relevante T-Zellen *in vitro* zu expandieren. Die vorliegende Arbeit soll für diesen Versuch die methodische Grundlage liefern. Es konnte dokumentiert werden, dass prolongierte *in vitro*-Kultivierung die phänotypische Verteilung von T-Zell-Linien aus psoriatischer Haut verändert. Funktionell wurde eine starke Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und der Frequenz von CD3⁺CD8⁺CD25⁺ Zellen in läsionaler Haut festgestellt, was auf eine prominente Rolle der CD8⁺CD25⁺ T-Zell-Populationen bei der Krankheitspathogenese hinweist. Es wurde eine Methode zur Sortierung CD25⁺ T-Zellen aus betroffener Haut nach siebentägiger Kurzzeit-Kultur entwickelt sowie ein Protokoll zur Klonierung der isolierten T-Zellen mittels „limitierender Verdünnung“ etabliert. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine gezielte Blockierung der Apoptose die Expansion der generierten T-Zell Klone verbessern kann. Schließlich wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die Analyse polyklonaler T-Zell-Linien anstelle von T-Zell-Klonen mittels kombinatorischer Peptidbibliotheken im sog. „positional scanning“ Format evaluiert. Als Meßvariable für die T-Zell-Stimulation mit den Peptidbibliotheken wurde erstmals die intrazelluläre FACS-basierte Messung des BrdU-Einbaus angewendet. Es wurde festgestellt, daß sich in der Tat positions- und aminosäurespezifische Effekte der Peptidbibliotheken auf primäre polyklonale T-Zell-Populationen nachweisen lassen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen die methodische Grundlage zur genaueren Analyse von T-Zell-Spezifitäten bei der Psoriasis aber auch bei anderen Dermatosen mit T-Zell-Beteiligung dar.

Teile der hier vorgelegten Arbeit wurden in folgendem Fachaufsatz publiziert:

Kohlmann WM, Urban W, Sterry W, Foerster J: *Correlation of psoriasis activity with abundance of CD25⁺CD8⁺ T cells: Conditions for cloning T cells from psoriatic plaques. Exp Dermat, Oct 2004, 13 p 607-612*

7 Literaturverzeichnis

- 1 Ahangari G**, Halapi E, Tehrani MJ, Fransson J, Hammar H, Wigzell H: *RT-PCR topography of chronic psoriasis skin based on analysis of T-cell receptor B variable region gene usage. Scand J Immunol.* 1997 May; 45(5):534-40
- 2 Alam SM**, Travers PJ, Wung JL, Nasholds W, Redpath S, Jameson SC, Gascoigne NR: *T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. Nature.* 1996 Jun 13;381(6583):616-20
- 3 Albert LJ**, Inman RD: *Molecular mimicry and autoimmunity. N Engl J Med.* 1999 Dec 30;341(27):2068-74
- 4 Aoki S**, Yaoita H, Kitajima Y : *An elevated level of autoantibodies against 48-50-kd keratins in the serum of patients with psoriasis. J Invest Dermatol,* 1989, 92 p179-183
- 5 Asadullah K**, Volk HD, Sterry W: *Novel immunotherapies for psoriasis. Trends Immunol.* 2002 Jan;23(1):47-53.
- 6 Asano M**, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S: *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. J Exp Med.* 1996 Aug 1;184(2):387-96
- 7 Austin LM**, Coven TR, Bhardwaj N, Steinman R, Krueger JG: *Intraepidermal lymphocytes in psoriatic lesions are activated GMP-17(TIA-1)+CD8+CD3+ CTLs as determined by phenotypic analysis. J Cutan Pathol.* 1998 Feb;25(2):79-88
- 8 Austin LM**, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG: *The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. J Invest Dermatol.* 1999 Nov;113(5):752-9
- 9 Baecher-Allan C**, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA: *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol.* 2001 Aug 1;167(3):1245-53
- 10 Baker BS**, Griffiths CE, Lambert S, Powles AV, Leonard JN, Valdimarsson H, Fry L: *The effects of cyclosporin A on T lymphocyte and dendritic cell sub-populations in psoriasis. Br J Dermatol.* 1987 Apr;116(4):503-10

- 11 Baker BS**, Swain AF, Valdimarsson H, Fry L: *T-cell subpopulations in the blood and skin of patients with psoriasis. Br J Dermatol (England)*, Jan 1984, 110 (1) p37-44
- 12 Baker BS**, Powles AV, Lambert S, Valdimarsson H, Fry L: *A prospective study of the Koebner reaction and T lymphocytes in uninvolved psoriatic skin. Acta Derm Venereol*, 1988, 68 (5) p430-434
- 13 Barber LD**, Parham P: *Peptide binding to major histocompatibility complex molecules. Annu Rev Cell Biol*. 1993;9:163-206
- 14 Barker J N**. *Psoriasis as a T cell-mediated autoimmune disease. Hosp Med* 1998; 59: 530–533.
- 15 Bata-Csorgo Z**, Hammerberg C, Voorhees JJ: *Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. Cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes. J Clin Invest*, 1995, 95 p317-327
- 16 Bhardwaj N**, Bender A, Gonzalez N, Bui LK, Garrett MC, Steinman RM: *Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8+ T cells. J Clin Invest*. 1994 Aug;94(2):797-807
- 17 Blake J**, Johnston JV, Hellström KE, Marquardt H, Chen L: *Use of combinatorial peptide libraries to construct functional mimics of tumor epitopes recognized by MHC class I-restricted cytolytic T lymphocytes. J Exp Med*. 1996 Jul 1;184(1):121-30
- 18 Boehncke WH**, Küenzlen C, Zollner TM, Mielke V, Sterry W: *Predominant usage of distinct T-cell receptor V beta regions by epidermotropic T cells in psoriasis. Exp Dermatol*. 1994 Aug;3(4):161-3
- 19 Bohle B**, Schwihla H, Hu HZ, Friedl-Hajek R, Sowka S, Ferreira F, Breiteneder H, Bruijnzeel-Koomen CA, de Weger RA, Mudde GC, Ebner C, Van Reijsen FC: *Long-lived Th2 clones specific for seasonal and perennial allergens can be detected in blood and skin by their TCR-hypervariable regions. J Immunol*. 1998 Feb 15;160(4):2022-7
- 20 Borrás E**, Martin R, Judkowski V, Shukaliak J, Zhao Y, Rubio-Godoy V, Valmori D, Wilson D, Simon R, Houghten R, Pinilla C: *Findings on T cell specificity revealed by synthetic combinatorial libraries. Journal of Immunological Methods*, 2002, 267, p79-97

- 21 Bos JD**, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH: *Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies Arch Dermatol Res.* 1983;275(3):181-9
- 22 Bos JD**, Meinardi MM, van Joost T, Heule F, Powles AV, Fry L.: *Use of cyclosporin in psoriasis.Lancet.* 1989 Dec 23-30;2(8678-8679):1500-2.
- 23 Bos JD**, De Rie MA: *The pathogenesis of psoriasis: Immunological facts and speculations. Immunol Today (England),* Jan 1999, 20 (1) p40-46
- 24 Bos JD**, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, van der Loos CM, Kapsenberg ML: *The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. J Invest Dermatol.* 1987 May;88(5):569-73
- 25 Boussiotis VA**, Lee BJ, Freeman GJ, Gribben JG, Nadler LM: *Induction of T cell clonal anergy results in resistance, whereas CD28-mediated costimulation primes for susceptibility to Fas- and Bax-mediated programmed cell death. J Immunol.* 1997 Oct 1;159(7):3156-67
- 26 Bowcock AM.** *The Genetics of Psoriasis and Autoimmunity. Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005
- 27 Braun-Falco O**, Christophers E: *Structural aspects of initial psoriatic lesions. Arch Dermatol Forsch.* 1974;251(2):95-110
- 28 Brown DW**, Baker BS, Ovigne JM, Hardman C, Powles AV, Fry L: *Skin CD4+ T cells produce interferon-gamma in vitro in response to streptococcal antigens in chronic plaque psoriasis. J Invest Dermatol (United States),* Mar 2000, 114 (3) p576-580
- 29 Buttke TM**, Sandstrom PA: *Redox regulation of programmed cell death in lymphocytes. Free Radic Res.* 1995 May;22(5):389-97
- 30 Casanova JL**, Maryanski JL: *Antigen-selected T-cell receptor diversity and self-nonselhomology. Immunol Today.* 1993 Aug;14(8):391-4
- 31 Chang JC**, Smith LR, Froning KJ,Schwabe BJ, Laxer JA, Caralli LL, Kurland HH, Karasek MA, Wilkinson DI, Carlo DJ: *CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/ or V beta 13.1 genes. Proc Natl Acad Sci USA (United States),* Sep 27 1994, 91 (20) p9282-9286

- 32 Chang JC**, Smith LR: *Persistence of T-cell clones in psoriatic lesions. Arch Dermatol*, 1997, 133 p703-708
- 33 Costello P**, Bresnihan B, O'Farrelly C, FitzGerald O: *Predominance of CD8+ T lymphocytes in psoriatic arthritis. J Rheumatol*. 1999 May;26(5):1117-24
- 34 De Pità O**, Ruffelli M, Cadoni S, Frezzolini A, Biava GF, Simom R, Bottari V, De Sanctis G: *Psoriasis: comparison of immunological markers in patients with acute and remission phase. J Dermatol Sci*. 1996 Nov;13(2):118-24
- 35 De Rie MA**, Zonneveld IM, Witkamp L, Van Lier RA, Out TA, Bos JD: *Soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) is a marker of disease activity in psoriasis: a comparison of sIL-2R, sCD27, sCD4, sCD8 and sICAM-1. Acta Derm Venereol*. 1996 Sep;76(5):357-60
- 36 Dooley CT**, Houghten RA: *The use of positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries for the rapid determination of opioid receptor ligands. Life Sci*. 1993;52(18):1509-17
- 37 Duijvestijn AM**, Horst E, Pals ST, Rouse BN, Steere AC, Picker LJ, Meijer CJ, Butcher EC: *High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal antibody HECA-452. Am J Pathol*. 1988 Jan;130(1):147-55
- 38 Dupuy P**, Heslan M, Fraitag S, Hercend T, Dubertret L, Bagot M: *T-cell receptor-gamma/delta bearing lymphocytes in normal and inflammatory human skin. J Invest Dermatol*. 1990 Jun;94(6):764-8
- 39 Duquesnoy RJ**, Zeevi A: *Immunogenetic analysis of the HLA complex with alloreactive T cell clones. Hum Immunol*. 1983 Sep;8(1):17-23
- 40 Eedy DJ**, Burrows D, Bridges JM, Jones FG: *Clearance of severe psoriasis after allogenic bone marrow transplantation. BMJ*, Apr 1990, 300 (6729) p908
- 41 Eichler J**, Houghten RA: *Identification of substrate-analog trypsin inhibitors through the screening of synthetic peptide combinatorial libraries. Biochemistry*. 1993 Oct 19;32(41):11035-41
- 42 Elder JT**, Kaplan A, Cromie MA, Kang S, Voorhees JJ: *Retinoid induction of CRABP II mRNA in human dermal fibroblasts: use as a retinoid bioassay. J Invest Dermatol*. 1996 Mar;106(3):517-21

- 43 Elder JT:** *Psoriasis clinical registries, genetics, and genomics.* *Ann Rheum Dis.* 2005 Mar;64 Suppl 2:ii106-7. Review.
- 44 Ellis CN,** Fradin MS, Messana JM, Brown MD, Siegel MT, Hartley AH, Rocher LL, Wheeler S, Hamilton TA, Parish TG, et al.: *Cyclosporine for plaque-type psoriasis. Results of a multidose, double-blind trial.* *N Engl J Med.* 1991 Jan 31;324(5):277-84
- 45 Ferenczi K,** Burack L, Pope M, Krueger JG, Austin LM: *CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: blood and skin comparisons by flow cytometry.* *J Autoimmun.* 2000 Feb;14(1):63-78
- 46 Fierlbeck G,** Rassner G, Müller C: *Psoriasis induced at the injection site of recombinant interferon gamma. Results of immunohistologic investigations.* *Arch Dermatol.* 1990 Mar;126(3):351-5
- 47 Fischetti VA.:** *Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior.* *Clin Microbiol Rev.* 1989 Jul;2(3):285-314
- 48 Fleckenstein B,** Kalbacher H, Muller CP, Stoll D, Halder T, Jung G, Wiesmüller KH: *New ligands binding to the human leukocyte antigen class II molecule DRB1*0101 based on the activity pattern of an undecapeptide library.* *Eur J Biochem.* 1996 Aug 15;240(1):71-7
- 49 Ford CH,** Richardson VJ, Tsaltas G: *Comparison of tetrazolium colorimetric and [3H]-uridine assays for in vitro chemosensitivity testing.* *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;24(5):295-301
- 50 Friedrich M,** Krammig S, Henze M, Docke WD, Sterry W, Asadullah K: *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 (Germany),* Oct 2000, 292 (10) p519-521
- 51 Fuhlbrigge RC,** Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS: *Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells.* *Nature.* 1997 Oct 30;389(6654):978-81.
- 52 Gaur S,** Kesarwala H, Gavai M, Gupta M, Whitley-Williams P, Frenkel LD: *Clinical immunology and infectious diseases.* *Pediatr Clin North Am.* 1994 Aug;41(4):745-82

- 53 Gocinski BL**, Tigelaar RE: *Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. J Immunol.* 1990 Jun 1;144(11):4121-8
- 54 Gottlieb SL**, Gilleaudeau P, Johnson R, Estes L, Woodworth TG, Gottlieb AB, Krueger JG: *Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin(DAB389-IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenetic basis. Nature Medicine,* 1995, 1 (5) p442-447
- 55 Groh V**, Fabbi M, Hochstenbach F, Maziarz RT, Strominger JL: *Double-negative (CD4-CD8) lymphocytes bearing T-cell receptor alpha and beta chains in normal human skin. Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):5059-63 a
- 56 Groh V**, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB: *Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. J Exp Med.* 1989 Apr 1;169(4):1277-94
- 57 Grom AA**, Thompson SD, Luyrink L, Passo M, Choi E, Glass DN: *Dominant T-cell-receptor beta chain variable region V beta 14+ clones in juvenile rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):11104-8
- 58 Grubeck-Loebenstien B**, Lechner H, Trieb K: *Long-term in vitro growth of human T cell clones: can postmitotic 'senescent' cell populations be defined? Int Arch Allergy Immunol.* 1994 Jul;104(3):232-9
- 59 Gudmundsdottir AS**, Sigmundsdottir H, Sigurgeirsson B, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I: *Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? Clin Exp Immunol.* 1999 Sep;117(3):580-6
- 60 Gundlach BR**, Wiesmüller KH, Junt T, Kienle S, Jung G, Walden P: *Determination of T cell epitopes with random peptide libraries. Journal of Immunological Methods,* 1996, 192 p149-155
- 61 Gundlach BR**, Wiesmüller KH, Junt T, Kienle S, Jung G, Walden P: *Specificity and degeneracy of minor histocompatibility antigen-specific MHC-restricted CTL. J Immunol.* 1996 May 15;156(10):3645-51

- 62 Hanney H**, Gu SQ, Johannesson A, Sundkrist KG, Biberfeld P: *Subpopulations of mononuclear cells in microscopic lesions of psoriatic patients. Selective accumulation of suppressor/cytotoxic T cells in epidermis during the evolution of the lesion. J Invest Dermatol* 1989, 83:416-420.
- 63 Hemmer B**, Gran B, Zhao Y, Marques A, Pascal J, Tzou A, Kondo T, Cortese I, Bielekova B, Straus SE, McFarland HF, Houghten R, Simon R, Pinilla C, Martin R: *Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. Nature (America), 1999, Nat Med, Dec 1999 , 5 (12) p1375-1382*
- 64 Hemmer B**, Pinilla C, Appel J, Pascal J, Houghten R, Martin R: *The use of soluble synthetic peptide combinatorial libraries to determine antigen recognition of T cells. J Pept Res.* 1998 Nov;52(5):338-45
- 65 Hemmer B**, Pinilla C, Gran B, Vergelli M, Ling N, Conlon P, McFarland HF, Houghten R, Martin R: *Contribution of individual amino acids within MHC molecule or antigenic peptide to TCR ligand potency. J Immunol.* 2000 Jan 15;164(2):861-71
- 66 Hida S**, Ogasawara K, Sato K, Abe M, Takayanagi H, Yokochi T, Sato T, Hirose S, Shirai T, Taki S, Taniguchi T: *CD8(+) T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon-alpha/beta signaling. Immunity.* 2000 Nov;13(5):643-55
- 67 Hildeman DA**, Mitchell T, Teague TK, Henson P, Day BJ, Kappler J, Marrack PC: *Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. Immunity.* 1999 Jun;10(6):735-44
- 68 Hogquist KA**, Jameson SC, Bevan MJ. Hogquist KA, Jameson SC, Bevan MJ: *The ligand for positive selection of T lymphocytes in the thymus. Curr Opin Immunol.* 1994 Apr;6(2):273-8
- 69 Horrocks C**, Holder JE, Berth-Jones J, Camp R: *Antigen-independent expansion of T cells from psoriatic skin lesions: phenotypic characterization and antigen reactivity. Br J Dermatol (England), Sep 1997, 137 (3) p331-338*
- 70 Houghten RA**, Pinilla C, Blondelle SE, Appel JR, Dooley CT, Cuervo JH: *Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. Nature.* 1991 Nov 7;354(6348):84-6

- 71 Ikäheimo I**, Tiilikainen A, Karvonen J, Silvennoinen-Kassinen S: *HLA risk haplotype Cw6,DR7,DQA1*0201 and HLA-Cw6 with reference to the clinical picture of psoriasis vulgaris. Arch Dermatol Res.* 1996 Jun;288(7):363-5
- 72 Johnston A**, Gudjonsson J E, Sigmundsdottir H, Love T J, Valdimarsson H. *Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8(+) T cells. Clin Exp Immunol* 2004; 138: 83–93.
- 73 Kojima A**, Prehn RT: *Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. Immunogenetics.* 1981;14(1-2):15-27
- 74 Krammer PH**: *CD95's deadly mission in the immune system. Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):789-95
- 75 Krueger JG**, Wolfe JT, Nabeya RT, Vallat VP, Gilleaudeau P, Heftler NS, Austin LM, Gottlieb AB: *Successful ultraviolet B treatment of psoriasis is accompanied by a reversal of keratinocyte pathology and by selective depletion of intraepidermal T cells. J Exp Med.* 1995 Dec 1;182(6):2057-68
- 76 La Rosa C**, Krishnan R, Markel S, Schneck JP, Houghten R, Pinilla C, Diamond DJ: *Enhanced immune activity of cytotoxic T-lymphocyte epitope analogs derived from positional scanning synthetic combinatorial libraries. Blood.* 2001 Mar 15;97(6):1776-86
- 77 Lee DS**, White DE, Hurst R, Rosenberg SA, Yang JC: *Patterns of relapse and response to retreatment in patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma who responded to interleukin-2-based immunotherapy. Cancer J Sci Am.* 1998 Mar-Apr;4(2):86-93
- 78 Leung DYM**, Travers JB, Giorno R, Norris DA, Skinner R, Aelion J, Kazemi LV, Kim MH, Trumble AE, Kotb M: *Evidence for a streptococcal superantigen-driven process in acute guttate psoriasis. J Clin Invest,* 1995, 96 p2106-2112
- 79 Lewis HM**, Baker BS, Bokth S, Powles AV, Garioch JJ, Valdimarsson H, Fry L: *Restricted T-cell receptor V beta gene usage in the skin of patients with guttate and chronic plaque psoriasis. Br J Dermatol,* Nov 1993, 129 (5) p514-520

- 80 Lin WJ**, Norris DA, Achziger M, Kotzin BL, Tomkinson B: *Oligoclonal expansion of intraepidermal T cells in psoriasis skin lesions. J Invest Dermatol (United States)*, Dec 2001, 117 (6) p1546-1553
- 81 Livingstone A**, Fathman CG: *Murine T cell clones. Methods Enzymol.* 1987;150:324-33
- 82 Lügering A**, Schmidt M, Lügering N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T: *Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. Gastroenterology.* 2001 Nov;121(5):1145-57
- 83 Maghni K**, Nicolescu OM, Martin JG: *Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4+ T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) ELISA. J Immunol Methods.* 1999 Mar 4;223(2):185-94
- 84 Malinin TI**, Perry VP: *A review of tissue and organ viability assay. Cryobiology.* 1967 Nov-Dec;4(3):104-15
- 85 Mallon E**, Bunker CB: *HIV-associated psoriasis. AIDS Patient Care STDS*, Mar 2000, 14 (5), p239-246
- 86 Marples RR**, Heaton CL, Kligman AM: *Staphylococcus aureus in psoriasis. Arch Dermatol.* 1973 Apr;107(4):568-70
- 87 Marrack P**, Bender J, Hildeman D, Jordan M, Mitchell T, Murakami M, Sakamoto A, Schaefer BC, Swanson B, Kappler J: *Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. Nat Immunol.* 2000 Aug;1(2):107-11
- 88 Martinon F**, Rabian C, Loiseau P, Ternynck T, Avrameas S, Colombani J: *In vitro proliferation of human lymphocytes measured by an enzyme immunoassay using an anti-5-bromo-2-deoxyuridine monoclonal antibody. J Clin Lab Immunol.* 1987 Jul;23(3):153-9
- 89 Mason D**, Powrie F.: *Control of immune pathology by regulatory T cells. Curr Opin Immunol.* 1998 Dec;10(6):649-55.
- 90 Matsushita S**, Tanaka Y, Matsuoka T, Nakashima T: *Clonal expansion of freshly isolated CD4T cells by randomized peptides and identification of peptide ligands using combinatorial peptide libraries. Eur J Immunol.* 2001 Aug;31(8):2395-402

- 91 Messen A**, Trommler P, Vollmer S, Schendel D, Albert E, Gurtler L, Riethmuller G, Prinz JC: *Evidence for an antigen-specific cellular immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. J Immunol (United States)* , Oct 1995, 155 (8) p4078-4083
- 92 Messele T**, Roos MT, Hamann D, Koot M, Fontanet AL, Miedema F, Schellekens PT, Rinke de Wit TF: *Nonradioactive techniques for measurement of in vitro T-cell proliferation: alternatives to the [(3)H]thymidine incorporation assay. Clin Diagn Lab Immunol.* 2000 Jul;7(4):687-92
- 93 Morganroth GS**, Chan LS, Weinstein GD, Voorhees JJ, Cooper KD.: *Proliferating cells in psoriatic dermis are comprised primarily of T cells, endothelial cells, and factor XIIIa+ perivascular dendritic cells. J Invest Dermatol.* 1991 Mar;96(3):333-40
- 94 Mrowietz U**, Elder JT, Barker J: *The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients. Arch Dermatol Res.* 2007 December; 298(7): 309–319.
- 95 Nguyen T**, Russell J: *The regulation of FasL expression during activation-induced cell death (AICD). Immunology.* 2001 Aug;103(4):426-34
- 96 Nicolas JF**, Chamchick N, Thivolet J, Wijdenes J, Morel P, Revillard JP: *CD4 antibody treatment of severe psoriasis Lancet.* 1991 Aug 3;338(8762):321
- 97 Nickoloff BJ**, Wrone-Smith T: *Animal models of psoriasis. Nat Med.* 1997 May;3(5):475-6
- 98 Nickoloff BJ**, Wrone-Smith T: *Superantigens, autoantigens, and pathogenic T cells in psoriasis. J Invest Dermatol.* 1998 Apr;110(4):459-60
- 99 Nickoloff BJ**, Wrone-Smith: *Injection of Pre-Psoriatic skin with CD4+T-Cells induces psoriasis. Am J Pathol* , Jul 1999, 155 (1) p145-158a
- 100 Nickoloff BJ**, Wrone-Smith T, Bonish B, Porcelli SA.: *Response of murine and normal human skin to injection of allogeneic blood-derived psoriatic immunocytes: detection of T cells expressing receptors typically present on natural killer cells, including CD94, CD158, and CD161. Arch Dermatol.* 1999 May;135(5):546-52.

- 101 Nickoloff BJ:** *The cytokine network in psoriasis. Arch Dermatol (United States)*, Jun 1991, 127 (6) p871-884
- 102 Nickoloff BJ:** *The immunologic and genetic basis of psoriasis. Arch Dermatol (United States)*, Sep 1999, 135 (9) p1104-1110b
- 103 Ockenfels HM:** *Trigger factors for psoriasis. Hautarzt.* 2003 Mar;54(3):215-23. Epub 2003 Feb 21
- 104 Oksenberg JR,** Panzara MA, Begovich AB, Mitchell D, Erlich HA, Murray RS, Shimonkevitz R, Sherritt M, Rothbard J, Bernard CC, et al.: *Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. Nature.* 1993 Mar 4;362(6415):68-70
- 105 Ortiz-Urda S;** Rappersberger K: *New immunosuppressive agents for treating psoriasis*
Hautarzt. 2003 Mar;54(3):230-6.
- 106 Ovigne JM,** Baker BS, Brown DW, Powles AV, Fry L: *Epidermal CD8+ T cells in chronic plaque psoriasis are Tc1 cells producing heterogeneous levels of interferon-gamma. Exp Dermatol (Denmark)*, Jun 2001, 10 (3) p168-174
- 107 Ovigne JM,** Baker BS, Davison SC, Powles AV, Fry L: *Epidermal CD8+ T cells reactive with group A streptococcal antigens in chronic plaque psoriasis. Exp Dermatol.* 2002 Aug;11(4):357-64
- 108 Ozawa M,** Aiba S. *Immunopathogenesis of psoriasis. Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3: 137–144.
- 109 Pawelec G,** Barnett Y, Mariani E, Solana R: *Human CD4+ T cell clone longevity in tissue culture: lack of influence of donor age or cell origin. Exp Gerontol.* 2002 Jan-Mar;37(2-3):265-9
- 110 Pawelec G,** Wernet P: *Restimulation properties of human alloreactive cloned T-cell lines. Dissection of HLA-D-region alleles in population studies and in family segregation analysis. Immunogenetics.* 1980;11(5):507-19
- 111 Picker LJ,** Terstappen LW, Rott LS, Streeter PR, Stein H, Butcher EC: *Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. J Immunol.* 1990 Nov 15;145(10):3247-55

- 112 Pinilla C**, Appel JR, Blanc P, Houghten RA : *Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. Biotechniques.* 1992 Dec;13(6):901-5
- 113 Pinilla C**, Appel JR, Houghten RA: *Investigation of antigen-antibody interactions using a soluble, non-support-bound synthetic decapeptide library composed of four trillion (4×10^{12}) sequences.* Biochem J. 1994 Aug 1;301 (Pt 3):847-53.
- 114 Pinilla C**, Martin R, Gran B, Appel JR, Boggiano C, Wilson DB, Houghten RA: *Exploring immunological specificity using synthetic peptide combinatorial libraries Curr Opin Immunol.* 1999 Apr;11(2):193-202
- 115 Pinilla C**, Rubio-Godoy V, Dutoit V, Guillaume P, Simon R, Zhao Y, Houghten RA, Cerottini JC, Romero P, Valmori D: *Combinatorial peptide libraries as an alternative approach to the identification of ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes. Cancer Res.* 2001 Jul 1;61(13):5153-60
- 116 Prinz J C.** *Disease mimicry – a pathogenetic concept for T cell-mediated autoimmune disorders triggered by molecular mimicry? Autoimmun Rev* 2004; 3: 10–15.
- 117 Prinz J**, Braun-Falco O, Meurer M, Daddona P, Reiter C, Rieber P, Riethmüller G: *Chimaeric CD4 monoclonal antibody in treatment of generalised pustular psoriasis. Lancet.* 1991 Aug 3;338(8762):320-1
- 118 Prinz JC**, Gross B, Vollmer S, Trommler P, Strobel I, Meurer M, Plewig G: *T cell clones from psoriasis skin lesions can promote keratinocyte proliferation in vitro via secreted products. Eur J Immunol,* 1994, 24 (3) p593-598
- 119 Prinz JC:** *Psoriasis vulgaris-a sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. Clin Exp Dermatol (England),* Jun 2001, 26 (4) p326-332
- 120 Prinz JC:** *Which T cells cause psoriasis? Clin Exp Dermatol (England),* Jul 1999, 24 (4) p291-295
- 121 Prinz JC:** *The role of T cells in psoriasis. J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003 May;17(3):257-70. Review.

- 122 Prinz JC**, Vollmer S, Boehncke WH, Menssen A, Laisney I, Trommler P: *Selection of conserved TCR VDJ rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. Eur J Immunol.* 1999 Oct;29(10):3360-8
- 123 Rammensee HG**, Friede T, Stevanović S: *MHC ligands and peptide motifs: first listing. Immunogenetics.* 1995;41(4):178-228
- 124 Rathmell JC**, Thompson CB: *Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S97-107
- 125 Refaeli Y**, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK: *Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. Immunity.* 1998 May;8(5):615-23
- 126 Riethmüller G**, Rieber EP, Kiefersauer S, Prinz J, van der Lubbe P, Meiser B, Breedveld F, Eisenburg J, Krüger K, Deusch K, et al.: *From antilymphocyte serum to therapeutic monoclonal antibodies: first experiences with a chimeric CD4 antibody in the treatment of autoimmune disease. Immunol Rev.* 1992 Oct;129:81-104
- 127 Rieux-Laucat F**, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP: *Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. Science.* 1995 Jun 2;268(5215):1347-9
- 128 Robert C**, Kupper TS: *Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. N Engl J Med.* 1999 Dec 9;341(24):1817-28
- 129 Robinson JH**, Kehoe MA: *Group A streptococcal M proteins: virulence factors and protective antigens. Immunol Today,* 1992, 13 p362-367
- 130 Rubio-Godoy V**, Dutoit V, Zhao Y, Simon R, Guillaume P, Houghten R, Romero P, Cerottini J, Pinilla C, Valmori D: *Positional scanning-synthetic peptide library-based analysis of self- and pathogen-derived peptide cross-reactivity with tumor-reactive Melan-A-specific CTL. J Immunol,* Nov 2002, 169 (10) p5696-5707
- 131 Rubio-Godoy V**, Dutoit V, Rimoldi D, Lienard D, Lejeune F, Speiser D, Guillaume P, Cerottini JC, Romero P, Valmori D: *Discrepancy between ELISPOT IFN-gamma secretion and binding of A2/peptide multimers to TCR reveals interclonal dissociation of CTL effector function from TCR-peptide/MHC complexes half-life. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10302-7. Epub 2001 Aug 21

- 132 Sabat R**, Philipp S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K: *Immunopathogenesis of Psoriasis. Experimental Dermatology*, 2007 16 (10), 779–798
- 133 Sadlack B**, Löhler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, Noelle RJ, Horak I: *Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells*. *Eur J Immunol*. 1995 Nov;25(11):3053-9
- 134 Schitteck B**, Rajewsky K: *Ma e*. 1990 Aug 23;346(6286):749-51
- 135 Schlaak JF**, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B: *T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset*. *J Invest Dermatol (United States)*, Feb 1994, 102 (2) p145-149
- 136 Schmitt-Egenolf M**, Boehncke WH, Christophers E, Ständer M, Sterry W: *Type I and type II psoriasis show a similar usage of T-cell receptor variable regions*. *J Invest Dermatol*. 1991 Dec; 97(6):1053-6
- 137 Schoenberger SP**, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ: *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. *Nature*. 1998 Jun 4;393(6684):480-3
- 138 Schon MP**, Boehncke WH. *Psoriasis*. *N. Engl J Med*. 2005; 352: 1899-1912
- 139 Shiohara T**, Kobayashi M, Abe K, Nagashima M: *Psoriasis occurring predominantly on warts. Possible involvement of interferon alfa*. *Arch Dermatol*. 1988 Dec;124(12):1816-21
- 140 Sigmundsdóttir H**, Gudjónsson JE, Jónsdóttir I, Lúdvíksson BR, Valdimarsson H: *The frequency of CLA+ CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease*. *Clin Exp Immunol*. 2001 Nov;126(2):365-9
- 141 Sigmundsdóttir H**, Sigurgeirsson B, Troye-Blomberg M, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I: *Circulating T cells of patients with active psoriasis respond to streptococcal M-peptides sharing sequences with human epidermal keratins*. *Scand J Immunol*. 1997 Jun;45(6):688-97

- 142 Singer GG**, Abbas AK: *The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. Immunity.* 1994 Aug;1(5):365-71
- 143 Sospedra M**, Pinilla C, Martin R : *Use of combinatorial peptide libraries for T-cell epitope mapping. Methods,* 2003, 29 (3) p236-247
- 144 Stephens LA**, Mason D: *CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. J Immunol.* 2000 Sep 15;165(6):3105-10
- 145 Strickberger MW**: *Genetik*; Carl Hanser Verlag, 1988: 13
- 146 Sugerman PB, Bigby M**: *Preliminary functional analysis of human epidermal T cells. Arch Dermatol Res.* 2000 Jan;292(1):9-15
- 147 Sumida T**, Hoa TT, Asahara H, Hasunuma T , Nishioka K: *T cell receptor of Fas-sensitive T cells in rheumatoid synovium .J Immunol.*1997; 158: 1965-1970
- 148 Susin SA**, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prévost MC, Alzari PM, Kroemer G: *Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. J Exp Med.* 1999 Jan 18;189(2):381-94
- 149 Sytwu HK**, Liblau RS, McDevitt HO: *The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. Immunity.* 1996 Jul;5(1):17-30
- 150 Szabo SK**, Hammerberg C, Yoshida Y, Bata-Csorgo Z, Cooper KD : *Identification and quantitation of interferon-gamma producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4+ and CD8+ subsets. J Invest Dermatol (United States),* Dec 1998, 111 (6) p1072-1078
- 151 Takada S**, Engleman EG: *Evidence for an association between CD8 molecules and the T cell receptor complex on cytotoxic T cells. J Immunol.* 1987 Nov 15;139(10):3231-5
- 152 Tanaka Y**, Ogawa M, Nishimura Y, Matsushita S: *Efficient induction of human CD4+ T cell lines reactive with a self-K-ras-derived peptide in vitro, using a mAb to CD29. Hum Immunol.* 1998 Jun;59(6):343-51

- 153 Tassioulas I**, Duncan SR, Centola M, Theofilopoulos AN, Boumpas DT: *Clonal characteristics of T cell infiltrates in skin and synovium of patients with psoriatic arthritis. Hum Immunol.* 1999 Jun;60(6):479-91
- 154 Telfer N R**, Chalmers R J, Whale K, Colman G. *The role of streptococcal infection in the initiation of guttate psoriasis. Arch Dermatol* 1992; 128: 39–42.
- 155 Tewari M**, Telford WG, Miller RA, Dixit VM: *CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. J Biol Chem.* 1995 Sep 29;270(39):22705-8
- 156 Thivolet J**, Nicolas JF: *Immunointervention in psoriasis with anti-CD4 antibodies Int J Dermatol.* 1994 May;33(5):327-32
- 157 Thornberry NA**, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. Nature.* 1992 Apr 30;356(6372):768-74.
- 158 Tiilikainen A**, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M: *Psoriasis and HLA-Cw6. Br J Dermatol.* 1980 Feb;102(2):179-84
- 159 Turchin I**. Adams *SPDermacase. Psoriasis.* Can Fam Physician. 2006 Sep;52(9):1073, 1080.
- 160 Udaka K**, Wiesmüller KH, Kienle S, Jung G, Walden P: *Tolerance to amino acid variations in peptides binding to the major histocompatibility complex class I protein H-2Kb. J Biol Chem.* 1995 Oct 13;270(41):24130-4
- 161 Valdimarsson H**, Baker BS, Jonsdottir I, Fry L: *Psoriasis: A disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T-lymphocytes superantigens? Immunol Today (England),* 1995, 7 (9) p256-259
- 162 Van Parijs L**, Abbas AK: *Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. Curr Opin Immunol.* 1996 Jun;8(3):355-61
- 163 Vekony MA**, Holder JE, Lee AJ, Horrocks C, Eperon IC, Camp RD: *Selective amplification of T-cell receptor variable region species is demonstrable but not essential*

in early lesions of psoriasis vulgaris: analysis by anchored polymerase chain reaction and hypervariable region size spectratyping. J Invest Dermatol. 1997 Jul;109(1):5-13

164 Vollmer S, Menssen A, Prinz JC: *Dominant lesional T cell receptor rearrangements persist in relapsing psoriasis but are absent from nonlesional skin: evidence for a stable antigen-specific pathogenic T cell response in psoriasis vulgaris. J Invest Dermatol (United States)*, Nov 2001, 117 (5) p1296-1301

165 Vollmer S, Menssen A, Trommler P, Schendel D, Prinz JC : *T lymphocytes derived from skin lesions of patients with psoriasis vulgaris express a novel cytokine pattern that is distinct from that of T helper type 1 and T helper type 2 cells. Eur J Immunol (Germany)*, Oct 1994, 24 (10) p2377-2382

166 Wallace A, Koblan KS, Hamilton K, Marquis-Omer DJ, Miller PJ, Mosser SD, Omer CA, Schaber MD, Cortese R, Oliff A, Gibbs JB, Pessi A: *Selection of potent inhibitors of farnesyl-protein transferase from a synthetic tetrapeptide combinatorial library. J Biol Chem.* 1996 Dec 6;271(49):31306-11

167 Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S: *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. Nature.* 1992 Mar 26;356(6367):314-7

168 Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ: *Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Nov 21;92(24):11091-4

169 Weinshenker BG, Bass BH, Ebers GC, Rice GP: *Remission of psoriatic lesions with muromonab-CD3 (orthoclone OKT3) treatment. J Am Acad Dermatol.* 1989 Jun;20(6):1132-3

170 Wilson DB, Pinilla C, Wilson DH, Schroder K, Boggiano C, Judkowski V, Kaye J, Hemmer B, Martin R, Houghten RA: *Immunogenicity. I. Use of peptide libraries to identify epitopes that activate clonotypic CD4+ T cells and induce T cell responses to native peptide ligands. J Immunol.* 1999 Dec 15;163(12):6424-34

171 Wong RL, Winslow CM, Cooper KD: *The mechanisms of action of cyclosporin A in the treatment of psoriasis. Immunol Today.* 1993 Feb;14(2):69-74.

- 172 Wrone-Smith T**, Nickoloff BJ: *Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. J Clin Invest*, Oct 1996, 98 (8) p1878-1887
- 173 Wucherpfennig KW**, Zhang J, Witek C, Matsui M, Modabber Y, Ota K, Hafler DA: *Clonal expansion and persistence of human T cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. J Immunol*. 1994 Jun 1;152(11):5581-92
- 174 Zachariae H**. *Prevalence of joint disease in patients with psoriasis: implications for therapy. Am J Clin Dermatol* 2003; 4: 441–447.
- 175 Zhao Y**, Gran B, Pinilla C, Markovic-Plese S, Hemmer B, Tzou A, Whitney LW, Biddison WE, Martin R, Simon R: *Combinatorial peptide libraries and biometric score matrices permit the quantitative analysis of specific and degenerate interactions between clonotypic TCR and MHC peptide ligands. J Immunol*. 2001 Aug 15;167(4):2130-41
- 176 Zheng TS**, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL, Flavell RA: *Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13618-23

Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Wolfram Sterry für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit an der medizinischen Fakultät der Charité wissenschaftlich arbeiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. J. Förster für dir intensive und verlässliche Betreuung und Unterstützung und das kontinuierliche Engagement bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Wiebke, Kilian, Tumenjargal, Rodion und Florian für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft.

Der AG Walden für die freundliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft und die zur Verfügung gestellten Laborgeräte.

Clementia Pinilla, Eva Borrás und dem Rest der Arbeitsgemeinschaft des Torrey Pines Institute for molecular studies, San Diego CA/USA, die mir durch den Arbeitsaufenthalt in ihrem Labor die Einarbeitung in die Technik und Durchführung der Arbeit mit kombinatorischen Peptidbibliotheken ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt den Patientinnen und Patienten die an dieser Studie teilgenommen haben.

Vielen Dank an Judith für die persönliche und fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater Hansgeorg Kohlmann für die kritische Durchsicht dieser Arbeit, meiner Mutter Soboon Kohlmann für die kontinuierliche Motivation und Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung und meinen Geschwistern Irene, Patrick und Nathalie Kohlmann die mir stets eine hilfreiche und ermunternde Stütze waren.

Lebenslauf

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

Erklärung

Ich, Marina Wayan Kohlmann, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Isolierung, Expansion, Klonierung von T-Lymphozyten aus Psoriasisplaques sowie Evaluation der T-Zell-Rezeptor-Spezifität – Definition mittels kombinatorischer Peptidbibliotheken“ selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfaßt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift