

Aus der
Universitäts-Hautklinik Tübingen
Sektion Dermatologische Onkologie

**Charakterisierung von CD8+ T-Zell-Autoantigenen bei den
inflammatorischen Dermatosen Lichen
ruber und Psoriasis vulgaris**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Hofmeister, Sonja Theresia**

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Flatz
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Löffler

Tag der Disputation: 19.08.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Immunologische Grundlagen	1
1.1.1 Einteilung des Immunsystems	1
1.1.2 T-Zellen, T-Zell-Rezeptoren und Oberflächenmoleküle	1
1.2 Aufbau der Haut.....	3
1.2.1 Zelladhäsionsmoleküle	3
1.2.2 Keratine	4
1.3 Inflammatorische Dermatosen	6
1.3.1 Lichen ruber.....	6
1.3.2 Psoriasis	8
1.4 Autoantigene.....	11
1.4.1 Bekannte Autoantigene bei Lichen ruber und Psoriasis	11
1.5 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.2 Medien für die in vitro Stimulation humaner PBMCs.....	15
2.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie	15
2.1.4 Peptidpools	16
2.1.5 Software.....	19
2.2 Methoden	20

2.2.1	Gewinnung von Patientenproben.....	20
2.2.2	Isolierung von PBMCs mit Dichtegradientenzentrifugation	20
2.2.3	In vitro Stimulation humaner PBMCs	21
2.2.4	Durchflusszytometrie	26
2.2.5	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	28
3	Ergebnisse	31
3.1	Patientencharakteristika	31
3.2	In vitro Stimulationen	35
3.2.1	Reaktionen von CD8+ T-Zellen auf Keratine	36
3.2.2	Reaktionen von CD8+ T-Zellen auf Zelladhäsionsmoleküle	45
3.2.3	Reaktionen von CD8+ T-Zellen auf Psoriasis-Antigene	52
4	Diskussion	59
4.1	Aktivierung durch Peptidpools von Keratinen	62
4.2	Aktivierung durch Peptidpools von Zelladhäsionsmolekülen	66
4.3	Fehlende Aktivierung durch Peptidpools von Psoriasis-Antigenen	68
4.4	Geringe Aktivierungsrate	71
4.5	Limitationen und Verbesserungspotential	72
4.6	Ausblick	74
4.7	Schlussfolgerung	77
5	Zusammenfassung	78
6	Literaturverzeichnis	79
7	Erklärungen zum Eigenanteil	86
8	Danksagung	87
9	Anhang	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Interaktion einer T-Zelle und einer antigenpräsentierenden Zelle.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zelladhäsionsmoleküle zwischen Epidermis und Dermis (nach Bieber et al., 2010).....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Keratinozyten-Differenzierung	5
Abbildung 4: Hautmanifestation Lichen ruber mit charakteristischen Papeln	7
Abbildung 5: Hautmanifestation der Psoriasis mit Plaques am Kopf und an der Streckseite eines Beins.....	9
Abbildung 6: Zusammensetzung eines Protein-spannenden Peptidpools.....	16
Abbildung 7: Zusammensetzung eines Superpools	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung Durchflusszytometrie	26
Abbildung 9: Graphisch vereinfachte Darstellung der Messung in einem Durchflusszytometer bei Immunfärbung.....	27
Abbildung 10: Gating-Strategie zur Identifizierung CD8+ T-Zellen aus durchflusszytometrischen Daten beispielhaft bei Patient LR_01.	29
Abbildung 11: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem KRT-Superpool von PBMCs von 24 Patienten mit Lichen ruber.	38
Abbildung 12: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem KRT-Superpool von PBMCs von sechs Patienten mit Psoriasis.	39
Abbildung 13: Durchflusszytometrie Graphiken der Aktivierung der CD8+ T-Zellen von Patient LR_08.....	41
Abbildung 14: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit Protein-spannenden Peptidpools aus Keratinen von PBMCs von zwölf Patienten mit Lichen ruber und einem Patienten mit Psoriasis (PS_03)	44
Abbildung 15: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem ADH-Superpool von PBMCs von 24 Patienten mit Lichen ruber.	46

Abbildung 16: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem ADH-Superpool von PBMCs von sechs Patienten mit Psoriasis.	47
Abbildung 17: Durchflusszytometrie Graphiken der Aktivierung der CD8+ T-Zellen von Patient LR_11	49
Abbildung 18: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit Protein-spannenden Peptidpools aus den vier Zelladhäsionsmolekülen von PBMCs von sechs Patienten mit Lichen ruber und einem Patienten mit Psoriasis	51
Abbildung 19: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem PSO-Superpool von 24 Patienten mit Lichen ruber.	53
Abbildung 20: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem PSO-Superpool von PBMCs von sechs Patienten mit Psoriasis.	54
Abbildung 21: Durchflusszytometrie Graphiken der Aktivierung der CD8+ T-Zellen von Patient LR_07	56
Abbildung 22: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit den Protein-spannenden Peptidpools aus LL-37 und ADAMTSL5 von sieben Patienten mit Lichen ruber.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	14
Tabelle 2: Medien für die in vitro Stimulation humaner PBMCs.....	15
Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.	15
Tabelle 4: Protein-spannende Peptidpools.....	17
Tabelle 5: Superpools	18
Tabelle 6: CEF-Pool	19
Tabelle 7: Aktin-Pool	19
Tabelle 8: Verwendete Software	19
Tabelle 9: Überblick Lichen ruber Patientenkollektiv	32
Tabelle 10: Patientencharakteristika der Patienten mit Lichen ruber.....	32
Tabelle 11: Überblick Psoriasis Patientenkollektiv.....	34
Tabelle 12: Patientencharakteristika der Patienten mit Psoriasis.....	34

Abkürzungsverzeichnis

ADH.....	<i>Zelladhäsionsmoleküle</i>
Dsc 1	<i>Desmocollin 1</i>
Dsc 3	<i>Desmocollin 3</i>
Dsg 1	<i>Desmoglein 1</i>
Dsg 3	<i>Desmoglein 3</i>
HLA	<i>Humanes Leukozyten Antigen</i>
IF	<i>Intermediärfilament</i>
IFN- α	<i>Interferon-α</i>
IFN- γ	<i>Interferon-γ</i>
IL.....	<i>Interleukin</i>
IL-12.....	<i>Interleukin-12</i>
IL-2	<i>Interleukin-2</i>
KRT	<i>Keratin</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex, dt. Histokompatibilitätskomplex</i>
PBMCs.....	<i>peripheral blood mononuclear cells, dt. periphere mononukleäre Blutzellen</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline, dt. Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PSO.....	<i>Psoriasis</i>
Tc	<i>Zytotoxische T-Zelle</i>
Tc1	<i>Zytotoxische T-Zelle Typ 1</i>
Tc17	<i>Zytotoxische T-Zelle Typ 17</i>
Th	<i>T-Helferzelle</i>
Th1	<i>T-Helferzelle Typ 1</i>
Th17	<i>T-Helferzelle Typ 17</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor- α</i>

1 Einleitung

1.1 Immunologische Grundlagen

Das Immunsystem ist ein hochkomplexes Netzwerk verschiedenster Zellen und deren Signalstoffe, durch welche sie untereinander interagieren. Im Folgenden sollen nur die zum Verständnis wichtigsten Vorgänge skizziert werden.

1.1.1 Einteilung des Immunsystems

Das Immunsystem kann unterschieden werden in das angeborene und das erworbene Immunsystem. Während das angeborene Immunsystem unspezifisch arbeitet, bekämpft das erworbene Immunsystem Antigene wie beispielsweise Krankheitserreger spezifisch. Unterteilt werden kann das erworbene Immunsystem nochmals in eine humorale und zelluläre Immunantwort. Durch die Sekretion von Antikörpern sind B-Zellen Teil der humoralen Antwort. T-Zellen sind zentrale Akteure der erworbenen, zellulären Immunreaktion im Körper (Dong, 2021).

1.1.2 T-Zellen, T-Zell-Rezeptoren und Oberflächenmoleküle

Unter den T-Zellen werden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschieden. Diese haben unterschiedliche Funktionen bei der Immunabwehr des Körpers. CD4⁺ T-Zellen werden auch T-Helferzellen (Th) genannt, wobei CD8⁺ T-Zellen zytotoxische T-Zellen (Tc) darstellen. T-Helferzellen sind wichtig für eine Immunantwort, da sie viele immunologische Folgereaktionen einleiten. Im Gegensatz dazu können zytotoxische T-Zellen selbst ein Antigen bekämpfen (Mittrücker et al., 2014).

T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor-Komplex, mit dem sie ihr spezifisches Antigen erkennen können. Dieser Komplex besteht aus dem eigentlichen T-Zell-Rezeptor, mit dem das Antigen erkannt wird, und einem CD3-Komplex (Chetty & Gatter, 1994). Zudem benötigen sie einen Co-Rezeptor,

der bei der Antigenerkennung mit den Major histocompatibility complex-Oberflächenmolekülen (MHC, dt. Histokompatibilitätskomplex) der antigenpräsentierenden Zellen interagiert, welches man als MHC-Restriktion bezeichnet. Antigenpräsentierende Zellen sind zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen (Sprent, 1995). Die CD4⁺ T-Zellen besitzen einen CD4 Co-Rezeptor, der das MHC II-Oberflächenmolekül der antigenpräsentierenden Zellen erkennt. Auf dem MHC II werden Peptide präsentiert, die von extrazellulär in die Zelle gelangt sind. Die CD8⁺ T-Zellen exprimieren einen CD8 Co-Rezeptor, der ein MHC I-Oberflächenmolekül auf antigenpräsentierenden Zellen erkennt. Hier werden den CD8⁺ T-Zellen Peptide aus dem Inneren der Zelle präsentiert (Peters et al., 2020).

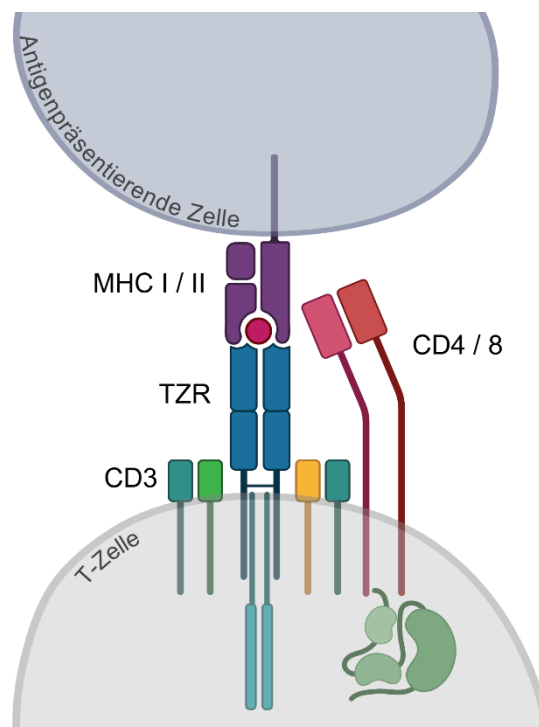


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Interaktion einer T-Zelle und einer antigenpräsentierenden Zelle. Mithilfe ihres T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TZR) erkennen T-Zellen ihr spezifisches Antigen, welches auf MHC I oder MHC II von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert wird. Wichtig ist dabei der CD3-Komplex (CD3), der CD4 Co-Rezeptor (CD4) auf T-Helferzellen und der CD8 Co-Rezeptor (CD8) auf zytotoxischen T-Zellen (Chetty & Gatter, 1994; Peters et al., 2020). Erstellt mit BioRender.com.

Nach der Erkennung ihres spezifischen Antigens proliferieren und differenzieren T-Zellen zu verschiedenen Subpopulationen an Effektorzellen (Zhu et al., 2010). Die verschiedenen Subpopulationen erfüllen wiederum verschiedene

Funktionen, in dem sie unterschiedliche Signalmoleküle wie Zytokine ausschütten. Zytotoxische T-Zellen (Tc) vom Typ 1 sekretieren beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Mittrücker et al., 2014). Interleukin-2 (IL-2) wird ebenso von aktivierten T-Zellen sekretiert und fördert deren Proliferation und Differenzierung. Daher wird es bei in vitro Versuchen verwendet, um die Zellen am Leben zu erhalten und ihre Expansion zu fördern (Zhang et al., 2021).

Haben T-Zellen noch kein Antigen erkannt, werden sie als naive T-Zellen bezeichnet. Charakteristisch für naive T-Zellen ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD45RA. Nicht naive T-Zellen haben schon einmal auf ein Antigen reagiert und exprimieren CD45RA nicht mehr auf ihrer Oberfläche, weshalb sie CD45RA negativ sind (Rheinländer et al., 2018).

1.2 Aufbau der Haut

Der Aufbau der Haut lässt sich grob in drei Schichten einteilen. Die Epidermis ist von außen sichtbar und bildet die Schutzschicht. Darunter schließt sich die Dermis an, welche die Epidermis beispielsweise mit Nährstoffen versorgt. Die Subcutis bildet die unterste Schicht der Haut (Arda et al., 2014).

1.2.1 Zelladhäsionsmoleküle

Zwischen der Epidermis und der Dermis der Haut sind die Zellen durch sogenannte Hemidesmosomen eng miteinander verbunden. Die Hemidesmosomen bestehen aus unterschiedlichen aneinander geketteten Proteinen, welche insgesamt basal eine zellüberspannende Einheit bilden. So liegen manche Teile der Hemidesmosomen intrazellulär und andere transmembranär. Ein Beispiel dafür ist das transmembranäre Protein BP180. Intrazellulär bestehen Kontakte zu Intermediärfilamenten des Zytoskeletts wie z.B. den Keratinen (McMillan et al., 2003).

Für die apikale und laterale interzelluläre Verankerung sind sogenannte Desmosomen zuständig. Diese sind wie die Hemidesmosomen aus unterschiedlichen Proteinen aufgebaut. Sie weisen verschiedene Lokalisationen und Verbindungen nach extrazellulär und zu den Intermediärfilamenten im Zellinneren auf. Transmembranäre Teile hiervon sind die Proteine Desmoglein 1 (Dsg 1), Desmoglein 3 (Dsg 3), Desmocollin 1 (Dsc 1) und Desmocollin 3 (Dsc 3) (Najor, 2018).

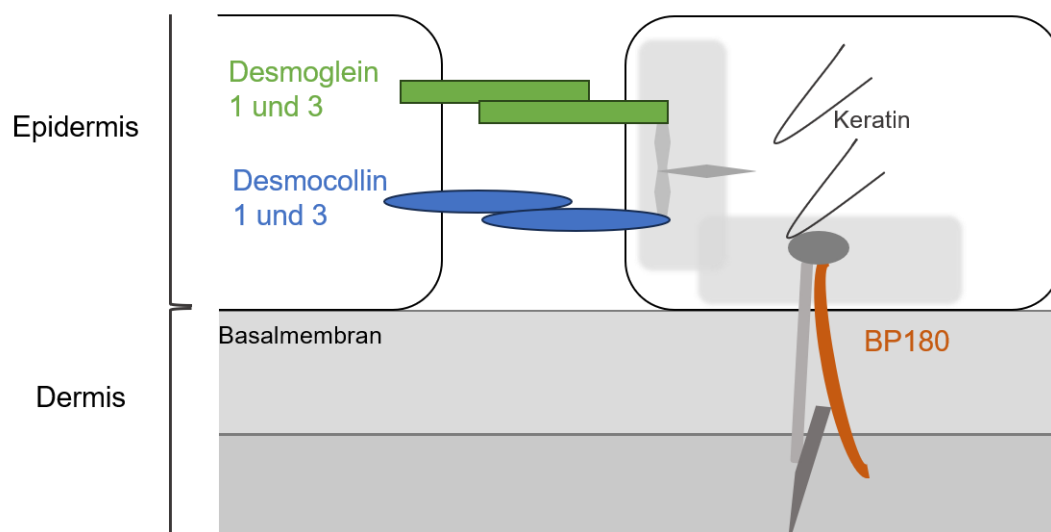


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zelladhäsionsmoleküle zwischen Epidermis und Dermis (nach Bieber et al., 2010). Die Zelladhäsionsmoleküle sind farblich hervorgehoben. Das Hemidesmosom BP180 (orange) verbindet die Epidermis mit der Dermis. Die Desmosomen Desmoglein 1 und 3 (grün) und Desmocollin 1 und 3 (blau) tragen zur apikalen und lateralen Verankerung bei.

1.2.2 Keratine

Intermediärfilamente (IFs) als Teil des Zytoskeletts sind vielfältige, aber grundlegende Komponenten in Zellen von vielzelligen Tieren, wie dem Menschen (Peter & Stick, 2015). Das Gerüst der epithelialen Zellen wird von den ersten zwei Klassen der IFs gebildet, welche 54 menschliche Keratinproteine, aufgeteilt in 28 saure Typ I Keratine und 26 basische Typ II Keratine, darstellen (Schweizer et al., 2006). In den meisten Geweben dimerisiert ein Typ I Keratin spezifisch mit einem Typ II Keratin, wobei die resultierenden Dimere zu Filamenten akkumulieren können (Schweizer et al., 2006).

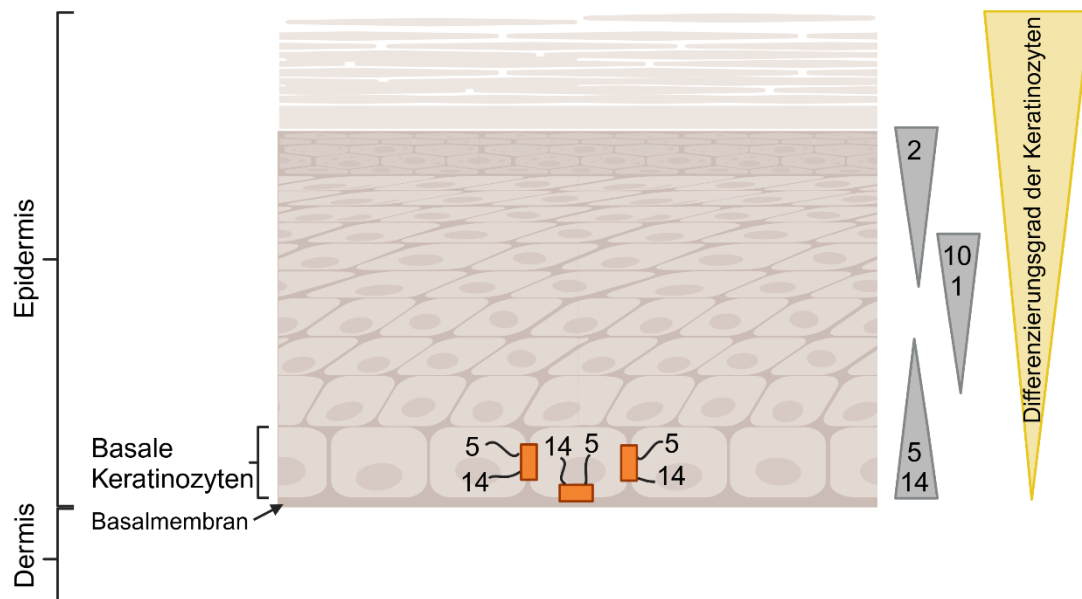


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Keratinozyten-Differenzierung. Keratinozyten differenzieren sich von basal nach apikal (rechts in gelb) u.a. durch Veränderung ihrer Keratine (rechts in grau). Basal kommen hauptsächlich KRT 5 und 14 (5, 14), suprabasal KRT 1 und 10 (1, 10) und apikal KRT 2 (2) vor. Desmosomen und Hemidesmosomen, die mit KRT 5 und KRT 14 verbunden sind, sind in Orange dargestellt (Zhang et al., 2019). Erstellt mit BioRender.com.

In den Keratinozyten der Basalzellschicht der Epidermis kommen hauptsächlich die Keratine (KRT) 5 und 14 (KRT5, KRT14) vor (Byrne et al., 1994). Ihre Verbindung zu den Zelladhäsionsmolekülen in Hemidesmosomen und Desmosomen (s. Kap 1.2.1 Zelladhäsionsmoleküle) trägt zur Befestigung der Zellen an der Basalmembran und zueinander bei (Jones & Green, 1991).

Basale Keratinozyten der Epidermis durchlaufen nach apikal eine Differenzierung und verändern dabei unter anderem die Expression der Keratine. So sind in verschiedenen Schichten der Epidermis unterschiedliche Keratine in den Keratinozyten vorhanden (Aldehlawi et al., 2020). Im Lauf der Zelldifferenzierung der Keratinozyten nach apikal werden die Keratine 5 und 14 herunterreguliert, während Keratin 1 und Keratin 10 in suprabasalen Keratinozyten exprimiert werden (Zhang et al., 2019). Im fortgeschrittenen Verlauf der Differenzierung wird Keratin 2, genauer 2e, exprimiert (Bloor et al., 2003).

Zudem wurde eine Hochregulierung von Keratin 6 mit Keratin 16 oder Keratin 17 bei der Wundheilung entdeckt. Keratin 17 wird eine Rolle in der Keratinozyten-Hyperproliferation bei Verletzung und bei der Pathogenese der Psoriasis

zugeschrieben (Zhang et al., 2019). Bei der Psoriasis sind Keratin 6, 16 und 17 in suprabasalen Keratinozyten stark exprimiert (Jin & Wang, 2014; Mommers et al., 2000; Thewes et al., 1991).

1.3 Inflammatorische Dermatosen

Unter inflammatorischen Dermatosen werden unterschiedliche chronisch entzündliche Hauterkrankungen zusammengefasst. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem der Lichen ruber und die Psoriasis, welche im Folgenden genauer beschrieben werden.

1.3.1 Lichen ruber

Der Lichen ruber ist eine chronisch inflammatorische Krankheit, die die Plattenepithelzellen der Haut und der Schleimhäute betreffen kann. Häufig zeigt sich die Erstmanifestation im mittleren Erwachsenenalter ohne Geschlechterprädisposition (Irvine et al., 1991), wobei die Ursache meist unklar ist.

Als Hautveränderungen (Lichen ruber planus) treten juckende, livide, polygonale, abgeflachte Papeln mit einem weißlichen Glanz auf (Boch et al., 2021). Zudem kann sich eine Schleimhautbeteiligung in Form von Erosionen zeigen, welche Brennen und Schmerzen auslösen können. Die für den Lichen ruber klassischen weißen Schleimhautveränderungen werden Wickham-Streifung genannt (Lehman et al., 2009). Schleimhautmanifestationen wie beispielsweise in der Mundhöhle werden als Lichen ruber mucosae bezeichnet. Weiterhin können beim Lichen ruber die Haarfollikel betroffen sein, welches als Lichen planopilaris oder Lichen ruber follicularis bezeichnet wird. Hierbei können schmerzende und juckende Areale, follikuläre Hyperkeratosen und eine Alopezie auftreten (Lehman et al., 2009).



Abbildung 4: Hautmanifestation Lichen ruber mit charakteristischen Papeln. Aus dem Archiv der Universitätsklinik Tübingen.

Die Krankheit wird als T-Zell-vermittelt angesehen. Maßgeblich dafür ist, dass vor allem CD8+ T-Zellen in die Haut übergehen (Boch et al., 2021). Durch diese Immunzellen kommt es zu einer „Interface Dermatitis“, bei welcher Keratinozyten durch die Immunzellen untergehen (Boch et al., 2021). Histologisch wird die Interface Dermatitis mit einer basalen Bande aus Lymphozyteninfiltrat beobachtet (Lehman et al., 2009). In der basalen Epidermis befinden sich auch die nekrotischen Keratinozyten, die als Kolloid-Körperchen bezeichnet werden (Wenzel, 2015).

Weiterhin spielen vermutlich Mastzellen und dendritische Zellen eine Rolle in der Pathogenese, welche passend in inflammatorischen Infiltraten von oralem Lichen ruber vermehrt auftreten (Ramalingam et al., 2018; Santoro et al., 2005). Dadurch besteht die Vermutung, dass Mastzelldegranulation und Proteaseaktivierung zur Akkumulation der T-Zellen beitragen, wodurch die Keratinozyten apoptotisch werden (Roopashree et al., 2010).

Zudem kommen veränderte Serumkonzentrationen vieler Interleukine, Chemokine und anderer Signalmoleküle vor (Boch et al., 2021). Hierbei wird IFN- γ als zentral in der Pathogenese angesehen (Lu et al., 2014).

Meistens ist der kutane Lichen ruber selbstlimitiert, aufgrund der Symptome der Patienten aber dennoch behandlungsbedürftig (Le Cleach & Chosidow, 2012). Beim mukosalen Lichen ruber ist eine Verlaufsbeobachtung wichtig, da maligne Transformationen der Erosionen stattfinden können. Zudem ist der mukosale Lichen ruber häufig schwer zu behandeln, insbesondere wenn ausgeprägte Erosionen vorhanden sind (Ioannides et al., 2020).

Aktuell werden primär topische und/oder systemische Therapien mit Glucocorticoiden, Retinoiden oder Calcineurin-Inhibitoren zur allgemeinen Unterdrückung des Immunsystems verwendet (Boch et al., 2021). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass spezifische Therapien mit Interleukin-Inhibitoren (Secukinumab, Ustekinumab, Guselkumab) erfolgsversprechend sind (Solimani et al., 2019).

1.3.2 Psoriasis

Die Psoriasis ist eine weltweit verbreitete chronische, inflammatorische Hauterkrankung. Sie tritt in jedem Alter auf und hat in verschiedenen Ländern eine schwankende Prävalenz von 0,51 % bis 11,43 % (Michalek et al., 2017).

Die Erkrankung tritt in verschiedenen Formen auf. Bei der Psoriasis vulgaris (auch Plaque-Psoriasis) zeigen sich scharf begrenzte erythematöse Plaques mit groblamellärer Schuppung. Die Läsionen sind zunächst klein und vergrößern sich zu großen Plaques, im Extremfall über den ganzen Körper. Typischerweise kommen solche Plaques an den Streckseiten der Extremitäten, im Sakralbereich und am Kopf vor (s. Abb. 5). Alles in allem sind der Verlauf, die Ausprägung und die Dauer der Schübe sehr individuell. Ungefähr 50 % der Patienten mit Plaque-Psoriasis haben eine Nagelbeteiligung (Griffiths et al., 2021). Außerdem haben diese Patienten ein 100fach höheres Risiko einer Gelenkbeteiligung, also eine Psoriasis-Arthritis zu entwickeln (Love et al., 2012). Bei einer Psoriasis palmopplantaris präsentiert sich die Psoriasis mit hyperkeratotischen, rissigen Plaques an Händen und Füßen (Griffiths et al., 2021). Eine weniger häufig vorkommende Form ist die Psoriasis guttata, bei der typischerweise akut viele,

kleine schuppige Plaques am Rumpf und den Extremitäten auftreten (Ko et al., 2010).



Abbildung 5: Hautmanifestation der Psoriasis mit Plaques am Kopf und an der Streckseite eines Beins. Aus dem Archiv der Universitätshautklinik Tübingen.

Zentral in der Pathogenese sind Reaktionen des Immunsystems, welche häufig durch die Kombination von Genetik und externen Faktoren verursacht werden. Es ist bekannt, dass bei der Pathogenese der Psoriasis viele verschiedene Akteure des Immunsystems, wie T-Zellen und dendritische Zellen, eine Rolle spielen (Griffiths et al., 2021). Relevante immunologische Vorgänge werden im Folgenden dargestellt.

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese nehmen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ein. Hierbei gelten die CD4⁺ T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) und Typ 17 (Th17) als entscheidend (Griffiths et al., 2021). Unter den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen ist der Subtyp 1 (Tc1) relevant (Austin et al., 1999). Dendritische Zellen akkumulieren in Psoriasis-Hautläsionen und produzieren Interferon- α (IFN- α), welches eine entscheidende Rolle in der Pathogenese darstellt (Nestle et al., 2005). Das von dendritischen Zellen produzierte Interleukin-12 (IL-12) fördert die Differenzierung von Th1-Zellen, welche u.a. IFN- γ produzieren (Griffiths et al., 2021). Dieses hat verschiedene Funktionen wie z.B. Förderung der Antigenprozessierung (Früh & Yang, 1999) und Expression von proinflammatorischen Mediatoren, welche Th1 und Tc1 Zellen rekrutieren (Griffiths et al., 2021). Zytotoxische T-Zellen vom Typ 17 (Tc17), Th17, und Th1-Zellen produzieren und reagieren auf TNF- α , welches für die Pathogenese eine entscheidende Rolle spielt (Austin et al., 1999; Jang et al., 2021; Yasuda et al., 2019). Neutrophilen Granulozyten wird auch eine Beteiligung an der Entwicklung der Psoriasis zugesprochen (Reich et al., 2015).

Histologisch ist ein Infiltrat von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in betroffenen Hautläsionen zu sehen, welches die Mitwirkung der T-Zellen in der Pathogenese unterstreicht (Nikaein et al., 1991).

Für die Psoriasis gibt es heutzutage eine Vielzahl an Therapieoptionen. Diese reichen von topischen Therapien mit Kortikosteroiden, Vitamin D-Analoga und Calcineurin-Inhibitoren über systemische Therapien mit u.a. Methotrexat und Ciclosporinen. Darüber hinaus gibt es verschiedene Biologika, welche verschiedene Signalmoleküle (IL-17, IL-23 und TNF- α) in den Signalwegen der Immunreaktion blockieren können (Griffiths et al., 2021).

1.4 Autoantigene

Autoimmunerkrankungen entstehen, wenn Immunzellen der Immuntoleranz entgehen können. Normalerweise soll die Immuntoleranz den Körper davor schützen, dass Immunzellen körpereigene Moleküle angreifen. Um diese Toleranz zu erzeugen, durchlaufen Lymphozyten, wie T-Zellen, in ihrer Entwicklung die positive und negative Selektion im Thymus. Zudem werden nach Verlassen des Thymus autoreaktive T-Zellen durch eine periphere Selektion beseitigt (Wang et al., 2015). Durch diese Mechanismen werden die T-Zellen, die sich gegen körpereigene Moleküle richten, erkannt und aussortiert. Autoreaktive T-Zellen können Autoimmunerkrankungen auslösen, wenn sie diesen Kontrollmechanismen entkommen. Sie können durch ein körpereigenes Molekül, ein Autoantigen, aktiviert werden, wobei eine Immunreaktion die Folge ist (Rose, 2004). Jedoch entsteht dadurch nicht direkt eine Autoimmunerkrankung, denn Autoimmunität kann auch physiologisch vorkommen (Salinas et al., 2013). Zudem spielen genetische Faktoren und Umweltfaktoren eine Rolle in der Entstehung einer Autoimmunerkrankung (Rose, 2004).

1.4.1 Bekannte Autoantigene bei Lichen ruber und Psoriasis

Bei den beiden inflammatorischen Erkrankungen Lichen ruber und Psoriasis sind Autoantigene von T-Zellen vorbeschrieben.

Schmidt et al. identifizierten die Zelladhäsionsmoleküle Dsg 3 und BP 180 (s. Kap. 1.2.1 Zelladhäsionsmoleküle) als Zielantigene von Th1/Th17-Zellen bei Patienten mit Lichen ruber (Schmidt et al., 2018).

Lande et al. konnten das antimikrobielle Peptid LL-37 (Cathelicidin) als T-Zell-Autoantigen bei Patienten mit Psoriasis bestimmen. Normalerweise wird es als Reaktion auf eine Infektion oder Verletzung der Haut produziert (Dorschner et al., 2001). Bei Patienten mit Psoriasis ist LL-37 in den betroffenen Hautläsionen überexprimiert (Lande et al., 2014). Autoreaktive CD8+ T-Zellen gegen LL-37

wurden bei knapp der Hälfte der Patienten mit Psoriasis nachgewiesen (Lande et al., 2014).

Ein weiteres bekanntes Autoantigen für CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Psoriasis stellt das ADAMTSL5 (engl. A disintegrin-like and metalloprotease domain with thrombospondin type I motifs like 5) dar, welches von epidermalen Melanozyten gebildet wird (Arakawa et al., 2015). ADAMTSL5 scheint eine Komponente der extrazellulären Matrix zu sein und hat vermutlich regulatorische Funktionen (Bader et al., 2012). Bonifacio et al. vermuten ein Vorhandensein von ADAMTSL5 in Keratinozyten (Bonifacio et al., 2016).

Johnston et al. fanden zudem heraus, dass bei Psoriasis-Patienten CD8+ T-Zellen auf das Keratin 17 epidermaler Zellen reagieren. Keratin 17 ist in betroffenen Hautläsionen überexprimiert und weist Sequenzhomologien mit dem M-Protein von Streptokokken auf (Johnston et al., 2004). Man geht davon aus, dass die T-Zellen gegen das Streptokokken-Protein gerichtet sind und auf Keratin 17 eine Kreuzreaktion zeigen (Valdimarsson et al., 2009).

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung von Autoantigenen von CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis.

Zum einen sollen die schon beschriebenen Autoantigene bei Lichen ruber (Dsg 3, BP 180) und bei Psoriasis (ADAMTSL5, LL-37 und Keratin 17) auf beide Erkrankungen getestet werden. Zum anderen sollen zusätzlich zu Dsg 3 und BP 180 die Zelladhäsionsmoleküle Desmoglein 1 (Dsg 1) und Desmocollin 3 (Dsc 3) untersucht werden. Darüber hinaus soll herausgefunden werden, ob andere Keratine (Keratin 1, 2, 5, 6A, 6B, 6C, 10, 14, 16) als Antigene autoreaktiver CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber oder Psoriasis dienen.

Durch in vitro Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs, engl. Peripheral blood mononuclear cells) aus Blut von Erkrankten und Messung mit einem Durchflusszytometer wird eine Aktivierung von CD8+ T-Zellen durch die verschiedenen oben beschriebenen Moleküle ermittelt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Reagenz	Anbieter
2 β -Mercaptoethanol	Gibco (31350010)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (T844.2)
Cyto-Fast Fix/Perm Puffer Set	BioLegend (426803)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Carl Roth (8043.1)
Human Serum	bioWest (S419H-100)
IL-2 (PROLEUKIN S Pulver z. Herst. e. Inj.-Lsg. od. Inf.-Lsg. 1 DSF)	Clinigen Healthcare
Kanamycin	Gibco (15160054)
Natriumazid	Carl Roth (K305.1)
Na-Pyruvat	Lonza (BE-13-115E)
Nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma-Aldrich (m7145)
Penicillin / Streptomycin (P/S)	Gibco (15140122)
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich (R8758)
RPMI Medium 1640 (1X)	Gibco (52400025)
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline, PBS)	Sigma-Aldrich (D8537)
Pancoll human	Pan biotech (P04-60500)
Trypanblaue Lösung (0,4 %)	Gibco (15250061)
Cryostor CS10	Stemcell Technologies (07930)
Brefeldin A aus Penicillium brefeldianum, 5 mg/ml in EtOH	Sigma-Aldrich (B7651)
Fix/Perm Puffer Set (Fix Perm Solution und Perm Wash Solution 10X)	BioLegend (426803)
Zombie Aqua Fixable Viability Kit	BioLegend (423101)

2.1.2 Medien für die in vitro Stimulation humaner PBMCs

Tabelle 2: Medien für die in vitro Stimulation humaner PBMCs.

Medium	Bestandteile
in-vitro-Stimulations-Kulturmedium (IVS-Medium)	RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich); 1 % P/S; 1 % Na-Pyruvat; 1 % nicht-essentielle Aminosäuren; 1 % Kanamycin; 1 ‰ 2β-Mercaptoethanol; 8 % Humanserum
Fluorescence Activated Cell Sorting Puffer (FACS Puffer)	PBS; 2 % BSA; 0,1 % NaN ₃ ; 2 mM EDTA

2.1.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Antigen	Fluorochrom	Anbieter
FITC anti-human CD154	CD154	FITC	BioLegend (310804)
APC/Cyanine7 anti-human CD3	CD3	APC/Cyanine7	BioLegend (317341)
PE/Cyanine7 anti-human CD4	CD4	PE/Cyanine7	BioLegend (317413)
Brilliant Violet 421 anti-human CD45RA	CD45RA	Brilliant Violet 421	BioLegend (304129)
PerCP anti-human CD8	CD8	PerCP	BioLegend (344707)
Brilliant Violet 605 anti-human IFN-γ Antibody	IFN-γ	Brilliant Violet 605	BioLegend (502535)
IFN gamma Monoclonal Antibody (B27), PE	IFN-γ	PE	InVitrogen (MHCIFG04)
APC anti-human TNF-α	TNF-α	APC	BioLegend (502913)

2.1.4 Peptidpools

Für die in vitro Stimulation humaner PBMCs wurden Protein-spannende Peptidpools, Superpools und ein CEF-Pool verwendet.

2.1.4.1 Protein-spannende Peptidpools

In einem Protein-spannenden Peptidpool befindet sich ein in 15mer Sequenzen mit 5 Aminosäuren Überlappung fragmentiertes Protein. Die bei Uniprot (The UniProt Consortium et al., 2023) gelistete kanonische Proteinsequenz eines Peptids wurde hier als Vorlage verwendet. In Abbildung 6 ist beispielhaft eine Protein-Sequenz in 15mer Peptiden mit fünf Aminosäuren Überlappung dargestellt.

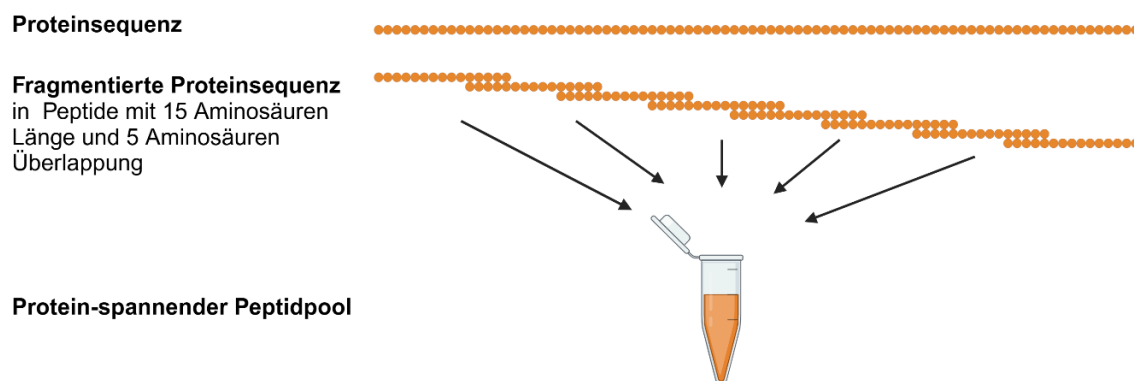


Abbildung 6: Zusammensetzung eines Protein-spannenden Peptidpools. Die gesamte Proteinsequenz ist fragmentiert in Peptide mit 15 Aminosäuren Länge. Die Peptide haben 5 Aminosäuren Überlappung. Alle Peptide zusammen bilden einen Protein-spannenden Peptidpool. Erstellt mit BioRender.com.

Alle Protein-spannenden Peptidpools wurden von Genscript (Rijswijk, Niederlande) individuell angefertigt (s. Tab. 4).

Tabelle 4: Protein-spannende Peptidpools

Proteine als Protein-spannende Peptidpools
ADAMTSL5
Bullöses Pemphigoid 180 (BP180)
Desmocollin 3 (Dsc 3)
Desmoglein 1 (Dsg 1)
Desmoglein 3 (Dsg 3)
LL-37
Keratin 1 (KRT1)
Keratin 2 (KRT2)
Keratin 5 (KRT5)
Keratin 6A (KRT6A)
Keratin 6B (KRT6B)
Keratin 6C (KRT6C)
Keratin 10 (KRT10)
Keratin 14 (KRT14)
Keratin 16 (KRT16)
Keratin 17 (KRT17)

2.1.4.2 Superpools

Als Superpool wird in dieser Arbeit die Mischung aus mehreren Protein-spannenden Peptidpools bezeichnet. Alle Superpools wurden von Genscript (Rijswijk, Niederlande) individuell angefertigt.

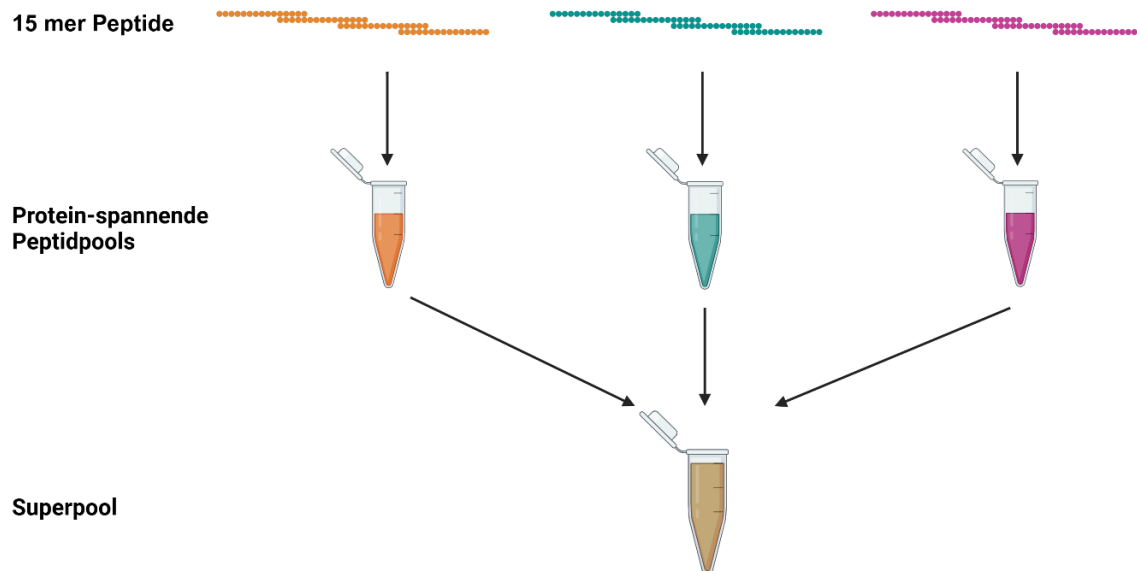


Abbildung 7: Zusammensetzung eines Superpools. 15mer Aminosäure-Sequenzen eines Peptids werden in einem Protein-spannenden Peptidpool gemischt. Diese Protein-spannenden Peptidpools bilden zusammen einen Superpool. Erstellt mit BioRender.com.

Tabelle 5: Superpools

Superpool	Enthaltene Protein-spannende Peptidpools
Keratin-Superpool	Keratin 1, 2, 5, 6A, 6B, 6C, 10, 14, 16 und 17
Psoriasis-Superpool	LL-37, ADAMTSL5
Zelladhäsionsmoleküle-Superpool (ADH-Superpool)	Desmocollin 3 (Dsc 3), Desmoglein 1 (Dsg 1), Desmoglein 3 (Dsg 3) und BP180

2.1.4.3 CEF-Pool

Der CEF-Pool besteht aus 32 Peptiden unterschiedlicher Sequenzen des Influenza-Virus, des Eppstein-Bar-Virus und des Zytomegalie-Virus.

Tabelle 6: CEF-Pool

Name	Anbieter	Produktnummer
CEF-Pool (extended)	JPT Peptide Technologies (Berlin, Deutschland)	PM-CEF-S-3

2.1.4.4 Aktin-Pool

Der Aktin-Pool besteht aus 92 Peptiden von menschlichem Aktin.

Tabelle 7: Aktin-Pool

Name	Anbieter	Produktnummer
PepMix Human (Actin)	JPT Peptide Technologies (Berlin, Deutschland)	PM-ACTS

2.1.5 Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Software	
FlowJo (Tree Star, Inc.)	Version 10.10
Microsoft PowerPoint	
Microsoft Excel	

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Patientenproben

Die hier verwendeten Proben von Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis wurden in der Universitätsklinik Tübingen im Zeitraum September 2021 bis Juni 2023 gesammelt. Kriterien, nach denen die Patienten ausgewählt wurden, waren entweder eine histologisch gesicherte Diagnose oder der strenge Verdacht auf die inflammatorische Hauterkrankung nach klinischen Gesichtspunkten. Die Patienten sollten in den letzten 6 Monaten keine Systemtherapie erhalten haben.

Alle Patienten stimmten einer venösen Blutentnahme zu Forschungszwecken freiwillig zu. Hierbei lagen die Einverständniserklärungen und das positive Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen 117/2021BO2 vor.

2.2.2 Isolierung von PBMCs mit Dichtegradientenzentrifugation

Mittels einer Dichtegradientenzentrifugation können die mononukleären Zellen aus Blut (engl.: peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) gewonnen werden. Mononukleäre Zellen schließen Lymphozyten und Monozyten ein. Zu den Lymphozyten gehören unter anderem T-Zellen und zu den Monozyten deren antigenpräsentierenden Zellen. Somit sind in den PBMCs alle benötigten Zellen enthalten, die für eine T-Zell-Stimulation (s. Kap. 2.2.3) benötigt werden (Grievink et al., 2016).

Von jedem Patienten wurde in EDTA-Röhrchen Blut abgenommen.

In 50 ml Falcon Tubes wurde das Blut mindestens 1:1 mit PBS auf 50 ml verdünnt und durch Invertieren vermischt.

Jeweils 25-30 ml des verdünnten Bluts wurden auf 15 ml Pancoll (PAN Biotech) geschichtet. Im Anschluss wurden die Röhrchen für 20 Minuten bei 900 g und 4 °C mit der niedrigsten Abbremsgeschwindigkeit zentrifugiert.

Die PBMCs wurden in ein neues Falcon Tube überführt und mindestens 1:1 mit PBS verdünnt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 900 g und 4 °C mit der höchsten Abbremsgeschwindigkeit wurde der Überstand verworfen. Das resultierende Zellpellet wurde in 1 ml PBS gelöst.

Um die Zellzahl zu ermitteln wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Dafür wurde die Zellsuspension 1:100 mit Trypanblau (Gibco) verdünnt, auf die Zählkammer aufgetragen und ausgezählt.

Die Zellen wurden auf 50 ml mit PBS aufgefüllt, erneut für 5 min bei 900 g und 4°C mit der höchsten Abbremsgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Für die Aufbewahrung wurden die PBMCs mit einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml in Cryostor CS10 (Stemcell) resuspendiert und in 1 ml Aliquots auf Cryo-Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden für 10 min bei 4 °C inkubiert, worauf sie in einer Einfrierhilfe bei -80 °C eingefroren wurden. Die Langzeitlagerung erfolgte ohne Einfrierhilfe zunächst für eine Woche bei -80 °C, und danach bei -150 °C.

2.2.3 In vitro Stimulation humaner PBMCs

Die in vitro Stimulation humaner PBMCs wurde entsprechend dem Protokoll der Publikation von Berner et al., durchgeführt (Berner et al., 2019).

2.2.3.1 Peptidpools

Für die in vitro Stimulation humaner PBMCs wurden die 3 Superpools „Keratin-Pool“, „Zelladhäsionsmoleküle-Pool“, „Psoriasis-Pool“ und die Protein-spannenden Peptidpools von Genscript (Rijswijk, Niederlande) verwendet.

Als Positivkontrolle wurde der CEF-Pool (extended) von JPT Peptide Technologies (Berlin, Deutschland) genutzt.

Zur Erkennung unspezifischer Hintergrundreaktionen wurde die Stimulation ausschließlich mit dem IVS-Kulturmedium (s. Tab. 2) durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurde die in vitro Stimulation der PBMCs mit den drei Superpools durchgeführt.

Abhängig von den Ergebnissen der ersten Stimulation mit den Superpools wurden weitere Stimulationen durchgeführt. Hat eine Aktivierung durch einen der Superpools stattgefunden, wurde die in vitro Stimulation einzeln mit den jeweils enthaltenen Protein-spannenden Peptidpools durchgeführt. Ergänzt wurde der Aktin-Pool von JPT Peptide Technologies (Berlin, Deutschland) als Negativkontrolle.

2.2.3.2 Zellkultur – Tag 0-8

Tag 0 – Aussäen der Zellen

An Tag 0 der T-Zell-Stimulation wurden die Zellen ausgesät. Die eingefrorenen PBMCs (s. Kap. 2.2.2 Isolierung von PBMCs mit Dichtegradientenzentrifugation) wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die aufgetauten PBMCs wurden in 20 ml RPMI + 1 % P/S aufgenommen und bei 491 g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml RPMI + 1 % P/S resuspendiert. Anschließend wurden die PBMCs mittels Neubauer-Zählkammer, wie oben beschrieben, gezählt.

Für die Stimulation werden ungefähr 0,5 – 1 Mio. PBMCs pro Well benötigt.

Die PBMCs wurden nochmals mit 10-20 ml RPMI + 1 % P/S für 5 Minuten bei 491 g und 4 °C zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgeleert. Im Anschluss wurden die PBMCs in einer Konzentration von 0,5 – 1 Mio. PBMCs pro 2 ml IVS-Kulturmedium ohne IL-2 resuspendiert. Zuletzt wurden 2 ml der Zellsuspension in jedes benötigte Well einer 24-Well-Platte gegeben und bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert.

Tag 1 – Stimulation

An Tag 1 erfolgte die Stimulation der PBMCs mit den entsprechenden Peptidpools. Als Erstes wurde, ohne die Zellschicht zu berühren, 1 ml Kulturmedium von jedem Well entnommen. Anschließend wurden die Peptide mit einer Konzentration von 2 ng/µl je Peptid in einem insgesamt Volumen von 2 ml hinzugefügt. Danach wurde auf jedes Well 1 ml des IVS-Mediums hinzugefügt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tag 3,5 und 7 – Mediumwechsel

An Tag 3, 5 und 7 wurde jeweils das Kulturmedium gewechselt. An jedem dieser Tage wurde IVS-Kulturmedium mit IL-2 (Proleukin, Clinigen Healthcare) frisch angesetzt. Pro Well wurden dafür 1 ml IVS-Medium und 0,3 µl IL-2 vermischt und 5x invertiert. Als Nächstes wurde von jedem Well ohne die Zellschicht zu berühren, 1 ml Kulturmedium entnommen. In jedes Well wurde nun je 1 ml des zuvor neu angesetzten Mediums pipettiert, sodass die finale Konzentration bei 100-200 U/ml IL-2 lag. Anschließend wurde die 24-Well-Platte wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.3.3 Restimulation und Färbung für das Durchflusszytometer

– Tag 9-13

An einem der Tage 9-13 fand die Restimulation der PBMCs und deren Färbung für das Durchflusszytometer (FACS) statt.

Transfer der Zellen

Die Zellen wurden mit einer sterilen Pipettenspitze vom Boden der 24-Well-Platte abgekratzt. Anschließend wurde das Volumen eines Wells in ein 15 ml Falcon mit 5 ml RPMI + 1 % P/S überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 491 g und 4 °C. Nach Verwerfen des Überstands wurden nochmals 5 ml RPMI + 1 % P/S hinzugefügt und für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 491 g und 4 °C. Im Anschluss wurde der Überstand so verworfen, dass noch maximal 300 µl RPMI + 1 % P/S

zum Resuspendieren der PBMCs enthalten war. Die PBMCs wurden in eine 96-Well-Platte überführt.

Restimulation

Die 96-Well-Platte wurde für 5 min bei 491 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand ausgeschlagen. Zu jedem Well wurden 160 µl IVS-Medium hinzugefügt. Daraufhin wurden die Peptidpools mit einer Konzentration von 2 ng/µl je Peptid in einem insgesamten Volumen von 200 µl hinzugegeben. Als nächstes wurde Brefeldin (Sigma-Aldrich) 1:100 in IVS-Medium verdünnt. In jedes Well wurden 40 µl des verdünnten Brefeldins pipettiert und für 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

FACS Färbung mit verschiedenen Antikörpern

Die 96-Well-Platte wurde für 5 min bei 491 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand ausgeschlagen. Ein erneutes Waschen mit 150 µl PBS je Well und eine Zentrifugation für 5 min bei 491 g und 4 °C folgte.

Färbung nach Viabilität

Um lebende Zellen zu färben wurde als erstes Zombie Aqua™ (Fixable Viability Kit., BioLegend) 1:1000 in PBS verdünnt. Je 100 µl wurden in die entsprechenden Wells gegeben und für 30 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit jeweils 150 µl FACS Puffer je Well gewaschen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 491 g und 4 °C wurde der Überstand ausgeschlagen.

Extrazelluläre Färbung

Für jedes Well wurden 0,5 µl PerCP anti-human CD8, FITC anti-human CD154 (= CD40L), APC/Cyanine 7 anti-human CD3, PE/Cyanine7 anti-human CD4 und 0,125 µl Brilliant Violet 421™ anti-human CD45RA mit 47,875 µl FACS Puffer gemischt. Davon wurden 50 µl in jedes Well hinzugefügt und für 30 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 150 µl FACS Puffer je Well gewaschen und für 5 min bei 491 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde ausgeschlagen.

Permeabilisierung

In jedes Well wurden 100 µl Fix und Perm Lösung (Cyto-Fast™ Fix/Perm Buffer Set, BioLegend) gegeben und daraufhin für 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 491 g und 4 °C. Danach wurde der Überstand ausgeschlagen.

Als Nächstes wurde ein Perm Puffer angesetzt mit pro Well 35 µl Perm Lösung und 315 µl vollentsalztem Wasser. Jedes Well wurde mit 150 µl Perm Puffer gewaschen und nach einer Zentrifugation für 5 min bei 491 g und 4 °C wurde der Überstand ausgeschlagen.

Intrazelluläre Färbung

Pro Well wurden 0,5 µl IFN gamma Monoclonal Antibody (B27), PE, oder Brilliant Violet 605™ anti-human IFN-γ Antibody und APC anti-human TNF-α mit 49 µl Perm Puffer verdünnt. Davon wurden in jedes Well 50 µl pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 60 min im Dunkeln bei 4 °C. Nach der Inkubation wurden in jedes Well 150 µl Perm Puffer gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 491 g und 4 °C mit anschließendem Ausschlagen des Überstands. Die PBMCs wurden in jeweils 150 µl FACS Puffer resuspendiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 491 g und 4 °C wurde der Überstand ausgeschlagen. Die PBMCs wurden in 200 µl FACS Puffer je Well resuspendiert.

Anschließend erfolgte entweder direkt die Messung am Durchflusszytometer oder eine Lagerung für maximal 2 Tage bei 4 °C im Dunkel.

Die PBMCs wurden an dem Durchflusszytometer Cytex Aurora (Cytex Biosciences) mit der Software SpectroFlo Version 3.1.0 analysiert.

2.2.4 Durchflusszytometrie

In einem Durchflusszytometer können Zellen mittels Lasern schnell auf verschiedene Eigenschaften untersucht werden.

Hierbei können sichtbare Lichtstreuung und beispielsweise Fluoreszenzen analysiert werden. Beim sichtbaren Streulicht werden die zwei Richtungen Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) gemessen (s. Abb. 8). Hierbei kann durch das Vorwärtsstreulicht die relative Größe und durch das Seitwärtsstreulicht die Granularität (intrazelluläre Bestandteile) der Zellen bestimmt werden (McKinnon, 2018).

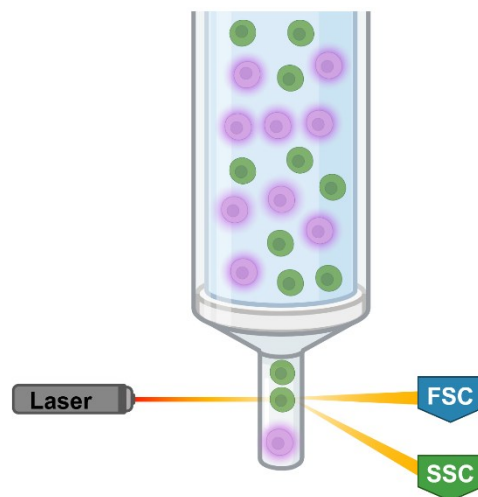


Abbildung 8: Schematische Darstellung Durchflusszytometrie. Das einer Laserquelle erzeugte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (SSC) und Vorwärtsstreulicht (FSC) im Durchflusszytometer erfasst. Erstellt mit BioRender.com.

Bei der Immunfärbung werden zudem Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper verwendet. Diese binden spezifisch an für bestimmte Zellen charakteristische Zellbestandteile und markieren diese somit. Beispielsweise können die Antikörper Rezeptoren auf der Oberfläche der Zelle oder aber auch Zytokine der Zellen binden. Um T-Zellen zu identifizieren kann der CD3-Komplex mittels eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers angefärbt werden. Für die Unterscheidung von Th- und Tc-Zellen werden Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper verwendet, die die CD4- und CD8-Rezeptoren anfärben. Über CD45RA Markierung kann zwischen naiven und nicht-naiven T-Zellen unterschieden werden. Die auf eine

Aktivierung von T-Zellen produzierten Zytokine (IFN- γ , TNF- α) können ebenfalls markiert werden.

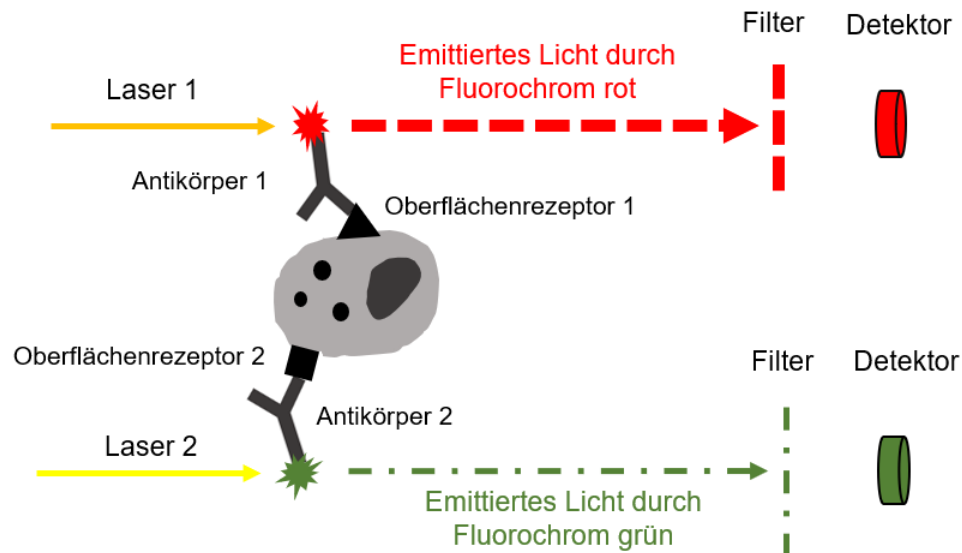


Abbildung 9: Graphisch vereinfachte Darstellung der Messung in einem Durchflusszytometer bei Immunfärbung. Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper binden spezifisch an Oberflächenmoleküle. Die verschiedenen Fluorochrome an den Antikörpern emittieren nach Anregung durch verschiedene Laser Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Verschiedene Filter und spezifische Detektoren messen die Wellenlänge und somit ist ein Rückschluss auf den gebundenen Antikörper möglich.

Die verschiedenen Fluorochrome an den Antikörpern werden jeweils durch Laser bestimmter Wellenlängen angeregt und emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Über verschiedene Filter, die nur ein eingeschränktes Wellenlängenspektrum passieren lassen, und spezifische Detektoren kann so jedes Fluorochrom gemessen und auf den gekoppelten Antikörper rückgeschlossen werden (s. Abb. 9). Das elektronische System generiert digitale Signale, die von einem Computer dargestellt werden können (McKinnon, 2018).

2.2.5 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

Die Auswertung und graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der Flow-Jo-Software 10.10.

2.2.5.1 Gating

Um aus den PBMCs die CD8⁺ T-Zellen herauszufiltern, wurde eine Gating-Strategie angewandt. Am Beispiel von LR_01 soll diese Gating-Strategie erläutert werden (s. Abb. 10).

Als Erstes wurden die Lymphozyten über ihre Größe und Granularität identifiziert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) diente hierbei als Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) als das Maß der Granularität.

Von dieser Zellpopulation wurden anschließend die einzelnen Zellen mittels FSC-Area (FSC-A) und FSC-Height (FSC-H) bestimmt. Als Nächstes konnten mittels Auftragen von Zombie Auqa gegen SSC-Area (SSC-A) die lebenden Zellen erkannt werden. Von diesen lebenden Zellen wurden über Auftragen der Fluorochrome APC-Cy7 (gekoppelt an Antikörper gegen CD3) gegen BV421 (gekoppelt an Antikörper gegen CD45RA) die nicht-naiven T-Zellen bestimmt. Durch Gegenüberstellung der Fluorochrome PE-Cy7 (gekoppelt an Antikörper gegen CD4) und PerCP (gekoppelt an Antikörper gegen CD8) konnte dann zwischen den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und den CD4⁺ T-Helferzellen unterschieden werden.

Für die letztendliche Auswertung wurde bei den CD8⁺ T-Zellen die Ausschüttung der beiden Aktivierungsmarker, TNF- α und IFN- γ , gegeneinander aufgetragen.

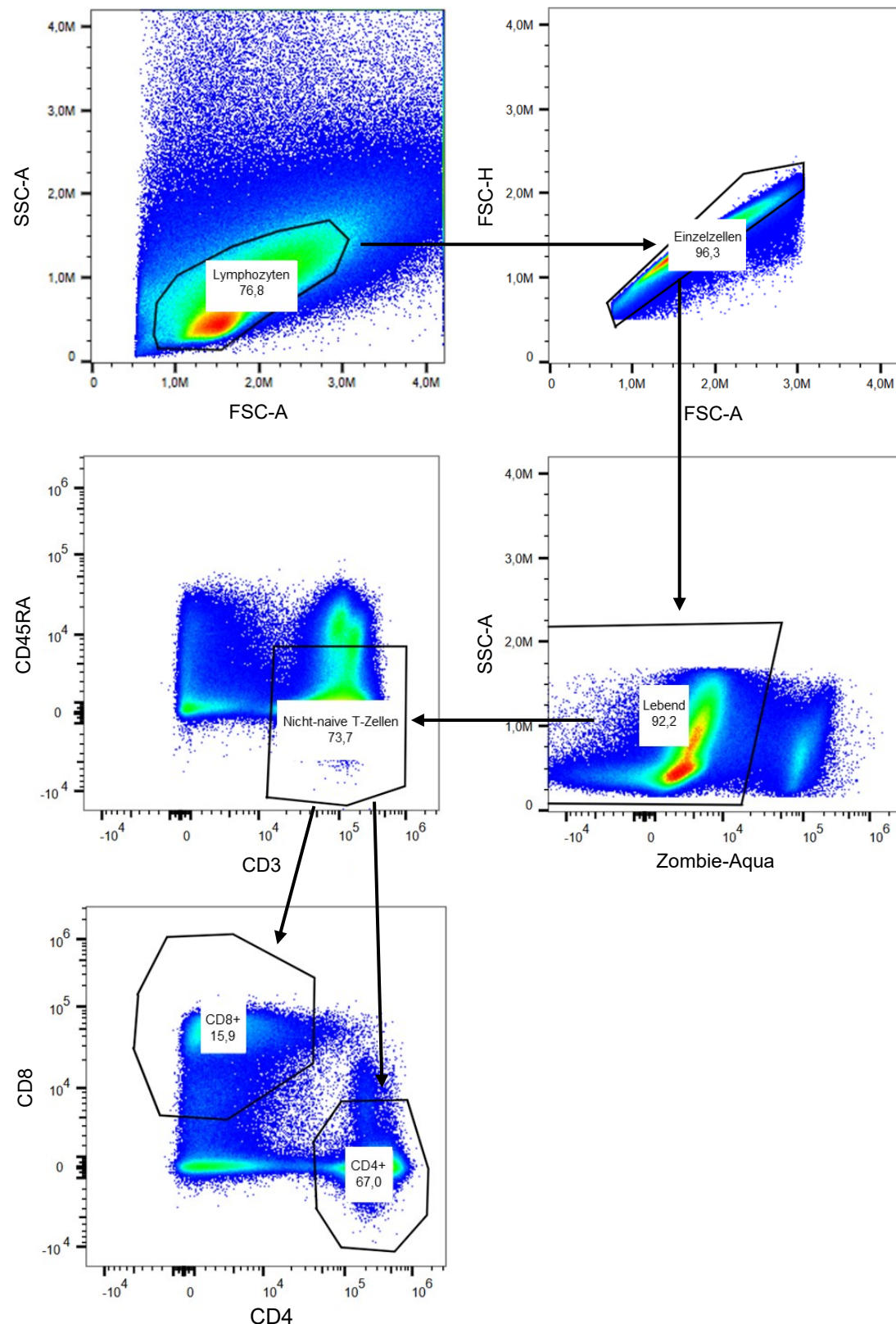


Abbildung 10: Gating-Strategie zur Identifizierung CD8⁺ T-Zellen aus durchflusszytometrischen Daten beispielhaft bei Patient LR_01. Als erstes wurden die Lymphozyten über SSC-A und FSC-A identifiziert. Anschließend Bestimmung der Einzelzellen über FSC-H und FSC-A. Dann Herausfiltern der lebenden Zellen mittels Zombie-Aqua. Bestimmung der nicht-naiven T-Zellen über CD45RA und CD3. Unterteilung in CD4⁺ und CD8⁺ mittels Gegenüberstellung von CD4 und CD8.

2.2.5.2 Definition einer Aktivierung

Der Fokus dieser Arbeit lag auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen. Zwei Kriterien wurden zur Definition einer Aktivierung herangezogen: Zum einen sollten mindestens doppelt so viele CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zum IVS-Medium TNF- α und IFN- γ ausschütten. Zum anderen sollten auch mindestens 1 % der CD8⁺ T-Zellen beide Aktivierungsmarker sekretieren. Diese CD8⁺ T-Zellen werden als IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ CD8⁺ T-Zellen bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

In die Experimente eingeschlossen wurden die Proben von 29 Patienten mit Lichen ruber und 6 Patienten mit Psoriasis.

Unter den Lichen ruber Patienten betrug das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme gerundet 50 Jahre, wobei der Median bei 53 Jahren lag. Hierbei waren 17 weibliche und 12 männliche Personen vertreten. Von diesen 29 Patienten wiesen 17 eine Hautbeteiligung in Form von Papeln auf. Von einer Schleimhautbeteiligung oral und/oder genital waren 11 Patienten betroffen. Für den Lichen ruber charakteristische Nagelveränderungen wurden bei vier und eine Haarbeteiligung in Form von Papeln an der Kopfhaut oder Haarverlust bei neun Personen beobachtet. Beginn der Symptomatik war bei knapp der Hälfte ein halbes Jahr vor Probenentnahme. Bei der anderen Hälfte der Patienten waren bereits mindestens ein Jahr Symptome vorhanden und bei sieben davon seit mindestens fünf Jahren. Die Angaben von zwei Patienten, die Symptomatik bestünde seit mehreren Jahren, wurden als vier Jahre gewertet. Bei einem Patienten stellte sich die orale Schleimhautbeteiligung als Zufallsbefund ohne Beschwerden heraus, weshalb hier kein Zeitrahmen des Auftretens eruiert werden konnte. In Tabelle 9 ist das Patientenkollektiv übersichtlich zusammengefasst. In Tabelle 10 sind die Daten patientenspezifisch dargestellt.

Tabelle 9: Überblick Lichen ruber Patientenkollektiv. Tabellarisch zusammengefasst sind verschiedene Charakteristika, Symptomatiken und der Beginn der Symptomatik aller Patienten. Haarbeteiligung entspricht Haarausfall oder Papeln am Kopf. Nicht bekannt (n.b.).

Diagnose		Lichen ruber			
Anzahl		29			
Alter bei Probenentnahme		Mittelwert	Median	Min	Max
		50	53	21	74
Geschlecht		Weiblich		Männlich	
		17		12	
Klinische Symptomatik					
	Hautbeteiligung	17			
	Schleimhautbeteiligung	11			
	Nagelbeteiligung	4			
	Haarbeteiligung	9			
Beginn der Symptomatik (in Monaten vor Blutentnahme)		<= 6	>= 12	>= 60	n.b.
		14	14	7	1

Tabelle 10: Patientencharakteristika der Patienten mit Lichen ruber. Dargestellt wird zu jedem Patienten (ID) die gegebene Diagnose, Geschlecht, Alter, die Symptomatik als Vorhandensein von Hautbeteiligung (H), Schleimhautbeteiligung (SH), Nagelbeteiligung (N) und/oder Haarbeteiligung (HA) und der Beginn der Symptomatik in Monaten vor der Blutentnahme (Beginn in Monaten vor BE).

ID	Diagnose	Geschlecht, Alter	Symptomatik				Beginn in Monaten vor BE
			H	SH	N	HA	
LR_01	Lichen ruber planus	w, 42	x	x			3
LR_02	Lichen ruber planus	w, 70	x	x	x		122
LR_03	Lichen ruber follicularis capillitii	w, 64				x	96
LR_04	Lichen ruber planus	m, 50	x		x	x	48
LR_05	Lichen ruber mucosae	w, 53		x			6
LR_06	Lichen ruber follicularis capillitii	w, 68				x	4
LR_07	Lichen ruber planus	m, 71	x		x		96
LR_08	Lichen ruber planus	m, 28	x	x			3
LR_09	Lichen ruber follicularis capillitii	m, 43		x		x	48
LR_10	Lichen ruber mucosae	m, 25		x			Zufalls- befund

ID	Diagnose	Geschlecht, Alter	Symptomatik				Beginn in Monaten vor BE
			H	SH	N	HA	
LR_11	Lichen ruber planus	w, 55	x				6
LR_12	Lichen ruber mucosae	m, 36		x			2
LR_13	Lichen ruber planus	w, 74	x				4
LR_14	Lichen ruber follicularis capillitii	w, 64				x	3
LR_15	Lichen ruber mucosae	w, 72		x			144
LR_16	Lichen ruber planus	m, 42	x	x			12
LR_17	Lichen ruber planus	m, 68	x				1,5
LR_18	Lichen ruber planus et mucosae	w, 33	x	x			6
LR_19	Lichen ruber mucosae	w, 62		x	x		132
LR_20	Lichen ruber planus verrucosus	m, 21	x				252
LR_21	Lichen ruber planus verrucosus	m, 21	x				252
LR_22	Lichen ruber planus	w, 38	x			x	48
LR_23	Lichen ruber planus verrucosus	w, 62	x				3
LR_24	Lichen ruber planus	w, 64	x				6
LR_25	Lichen planus follicularis capillitii	w, 67				x	36
LR_26	Lichen ruber follicularis capillitii	m, 34				x	36
LR_27	Lichen ruber planus	m, 24	x				0,75
LR_28	Lichen ruber follicularis capillitii	w, 68				x	24
LR_29	Lichen ruber planus	w, 43	x				6

Bei den sechs Patienten mit Psoriasis lag das Durchschnittsalter bei gerundet 39 Jahren mit einem Median von 32 Jahren. Beide Geschlechter waren gleich oft vertreten und alle Patienten wiesen Hautläsionen auf. Für die Psoriasis charakteristische Nagelveränderungen waren bei zwei Patienten vorhanden. Bei zwei Patienten bestand die Symptomatik kürzer als ein halbes Jahr vor

Probenentnahme, bei einem seit mindestens einem Jahr und bei drei seit mindestens fünf Jahren. In Tabelle 11 ist das Patientenkollektiv aller Patienten mit Psoriasis dargestellt, in Tabelle 12 können genauere Patientendaten eingesehen werden.

Tabelle 11: Überblick Psoriasis Patientenkollektiv. Tabellarisch zusammengefasst sind verschiedene Charakteristika, Symptomatiken und der Beginn der Symptomatik in Monaten vor der Blutentnahme aller Patienten.

Diagnose		Psoriasis			
Anzahl		6			
Alter bei Probenentnahme		Mittelwert	Median	Min	Max
		38,8	31,5	19	68
Geschlecht		Weiblich		Männlich	
		3		3	
Klinische Symptomatik					
	Hautbeteiligung	6			
	Nagelbeteiligung	2			
	Psoriasis-Arthritis	0			
Beginn der Symptomatik (in Monaten vor Blutentnahme)		<= 6	>= 12	>= 60	
		2	4	3	

Tabelle 12: Patientencharakteristika der Patienten mit Psoriasis. Dargestellt wird zu jedem Patienten (ID) die gegebene Diagnose, Geschlecht, Alter, die Symptomatik als Vorhandensein von Hautbeteiligung (H), Nagelbeteiligung (N) und/oder Psoriasis-Arthritis (PA) und der Beginn der Symptomatik in Monaten vor der Blutentnahme (Beginn in Monaten vor BE).

ID	Diagnose	Geschlecht, Alter	Symptomatik			Beginn in Monaten vor BE
			H	N	PA	
PS_01	Psoriasis vulgaris et palmoplantaris	m, 63	x			0,25
PS_02	Psoriasis vulgaris	w, 20	x	x		192 (4. LJ)
PS_03	Psoriasis vulgaris et capitis	w, 28	x	x		240 (Kindheit)
PS_04	Psoriasis guttata	w, 19	x			0,25
PS_05	Psoriasis vulgaris	m, 68	x			120
PS_06	Psoriasis vulgaris	m, 35	x			36

3.2 In vitro Stimulationen

Ziel war es, autoreaktive CD8⁺ T-Zellen gegen in der Haut vermehrt vorkommende Antigene im Blut von Patienten, die an Lichen ruber oder Psoriasis erkrankt sind, nachzuweisen. Hierzu wurden die aus dem Patientenblut isolierten PBMCs in vitro mit verschiedenen in Frage kommenden Peptiden stimuliert.

Um ein erstes Screening auf reagierende CD8⁺ T-Zellen vorzunehmen, wurden die PBMCs zuerst mit drei Superpools stimuliert, in welchen jeweils mehrere verschiedene Protein-spannende Peptidpools enthalten waren. Im Keratin-Superpool (KRT-Superpool) waren Protein-spannende Peptidpools von zehn verschiedenen Keratinen enthalten (Keratin 1, 2, 5, 6A, 6B, 6C, 10, 14, 16, 17). Der Zelladhäsionsmoleküle-Superpool (ADH-Superpool) bestand aus Aminosäuresequenzen von Desmoglein 1 und 3 (Dsg 1 und 3), Desmocollin 3 (Dsc 3) und BP180. Der dritte Pool wurde Psoriasis-Superpool (PSO-Superpool) genannt, in welchem Protein-spannende Peptidpools von LL-37 und ADAMTSL5 enthalten waren. Zur Erkennung unspezifischer Hintergrundreaktionen wurde in-vitro-Stimulations-Medium (IVS-Medium) verwendet. Als Negativkontrolle wurde ein Aktin-Pool genutzt. Als Positivkontrolle diente ein CEF-Pool, welcher aus 32 Peptiden unterschiedlicher Sequenzen des Influenza-Virus, des Epstein-Bar-Virus und des Zytomegalie-Virus bestand.

Nach Anfärbung charakteristischer Zellbestandteile mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern, welche eine spätere Klassifizierung der PBMCs in die verschiedenen Immunzellen ermöglicht, Messung an einem Durchflusszytometer und Durchführung der beschriebenen Gating-Strategie (s. Kap. 2.2.5.1) konnten CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden.

Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen wurde mittels Antikörper-Markierung von TNF- α und IFN- γ , die von aktivierten Zellen produziert werden, bestimmt. Hierbei waren die IFN- γ + TNF- α + CD8⁺ T-Zellen von besonderer Bedeutung.

Zwei Kriterien dienten der Definition einer Aktivierung: Einerseits sollten mindestens doppelt so viele CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zum IVS-Medium beide

Aktivierungsmarker ausschütten. Andererseits sollten mindestens 1 % der CD8+ T-Zellen IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen sein.

Konnte eine Aktivierung auf einen der oben genannten Superpools festgestellt werden, wurden die PBMCs der entsprechenden Patienten auf die jeweils enthaltenen Protein-spannenden Peptidpools einzeln in vitro stimuliert und nochmals wie beschrieben ausgewertet.

3.2.1 Reaktionen von CD8+ T-Zellen auf Keratine

3.2.1.1 Aktivierung von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis durch den Keratin-Superpool

Bei den CD8+ T-Zellen von sieben Patienten mit Lichen ruber und einem Patienten mit Psoriasis konnte eine Aktivierung durch den KRT-Superpool festgestellt werden.

Die Ergebnisse der in vitro Stimulationen mit dem KRT-Superpool sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

In Abb. 11 ist die Aktivierung der CD8+ T-Zellen durch den KRT-Superpool von Patienten mit Lichen ruber zu sehen. Auf der y-Achse ist der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen in Prozent angegeben. Hierbei ist die Reaktion auf den KRT-Superpool in rot und die Reaktion auf das IVS-Medium in grau dargestellt. Die entsprechenden Patienten-IDs können auf der x-Achse abgelesen werden.

Insgesamt zeigten sieben der 24 Patienten (29,16 %) eine Aktivierung durch den KRT-Superpool. Diese sind in der Graphik orange hervorgehoben.

Die stärkste Reaktion auf den KRT-Superpool hat Patient LR_08 mit 23,6 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen gezeigt. Am zweitstärksten aktiviert wurden die CD8+ T-Zellen von Patient LR_03 mit 14,6 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen, gefolgt

von Patient LR_14 mit 10,5 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen von LR_24 zeigten mit knapp über 8 % und die von LR_13 mit 6,43 % eine Aktivierung. Bei den Patienten LR_10 und LR_16 waren es ungefähr 2 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen, welches auch eine Aktivierung durch den KRT-Superpool bedeutet. Bei Patient LR_25 wurden zwar auch 2,49 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen bei der Stimulation mit dem KRT-Superpool gemessen, jedoch auch 1,42 % bei dem IVS-Medium, weshalb hier das Kriterium für eine Reaktion prozentual doppelt so viele CD8+ T-Zellen als beim Medium zu haben, nicht erfüllt war. Das gleiche ist der Fall für den Patienten mit der ID LR_04.

Bei den restlichen 17 von 24 Patienten (70,83 %) ließ sich keine Aktivierung von CD8+ T-Zellen durch den KRT-Superpool nachweisen.

Reaktionen von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber auf den KRT-Superpool

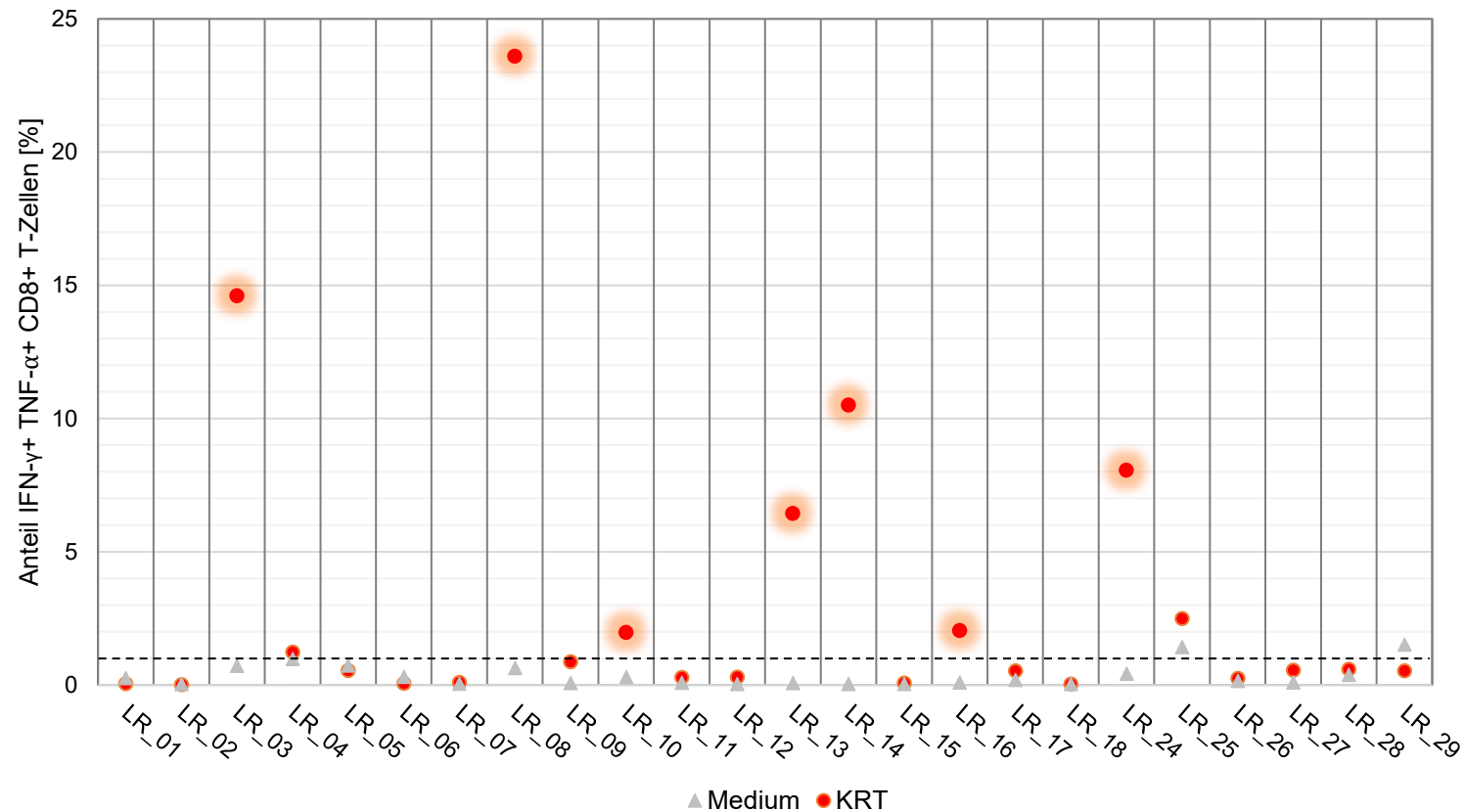


Abbildung 11: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem KRT-Superpool von PBMCs von 24 Patienten mit Lichen ruber. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Patienten, auf der y-Achse der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen dargestellt. Hilfslinie bei 1 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die Werte des IVS-Mediums (Medium) sind in grau, die Werte des KRT-Superpools (KRT, Keratin) in rot dargestellt. Die CD8+ T-Zellen von sieben Patienten zeigten eine Aktivierung durch den KRT-Superpool (Graphikpunkte hervorgehoben).

In Abb. 12 ist die Aktivierung von CD8+ T-Zellen auf den Keratin-Superpool von Patienten mit Psoriasis dargestellt. Auf der x-Achse sind die sechs Patienten mit Psoriasis zu sehen. An der y-Achse kann der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen in Prozent abgelesen werden. In rot sind die Werte für den KRT-Superpool und in grau die des IVS-Mediums dargestellt. Als einzige Probe wurden die CD8+ T-Zellen von Patient PS_03 durch den KRT-Superpool aktiviert. Hierbei zeigten sich 2,73 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die anderen fünf Patienten PS_01, PS_02, PS_04, PS_05 und PS_06 zeigten weniger als 0,2 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen durch die Stimulation mit dem KRT-Superpool, welches keine Aktivierung bedeutet.

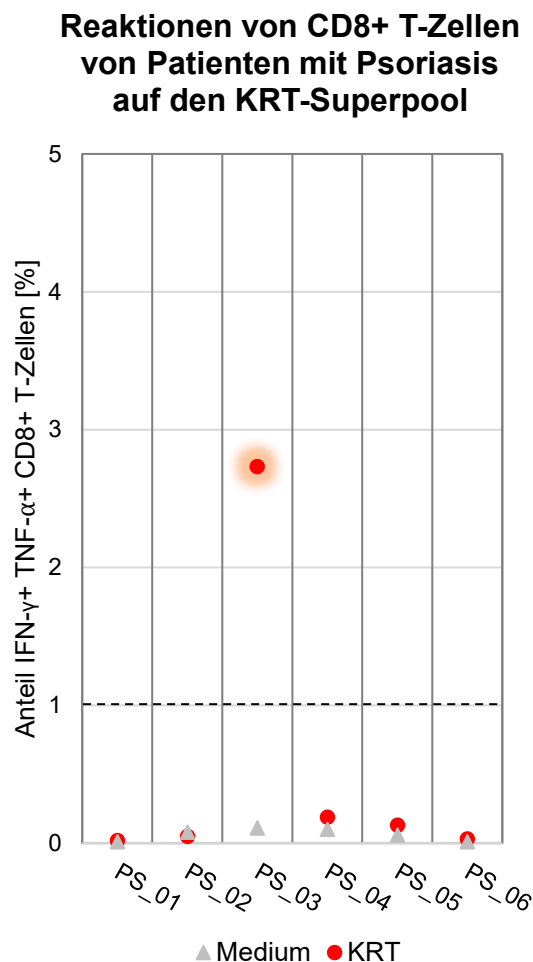


Abbildung 12: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem KRT-Superpool von PBMCs von sechs Patienten mit Psoriasis. Auf der x-Achse sind die Patienten, auf der y-Achse der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen zu sehen. Hilfslinie bei 1 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die Werte des IVS-Mediums (Medium) sind in grau, die des KRT-Superpools (KRT, Keratin) in rot dargestellt. Die CD8+ T-Zellen des Patienten PS_03 zeigten eine Aktivierung durch den KRT-Superpool (Graphikpunkt hervorgehoben).

Im Folgenden sind die Graphiken der Durchflusszytometrie beispielhaft von Patient LR_08, dessen CD8⁺ T-Zellen am stärksten durch den KRT-Superpool aktiviert wurden, dargestellt (s. Abb. 13).

Im linken Teil der Abbildung ist die Negativkontrolle mit IVS-Medium, im mittleren Bereich die Positivkontrolle mit dem CEF-Pool und rechts das Ergebnis der Stimulation mit dem KRT-Superpool zu sehen. Gegeneinander aufgetragen sind jeweils auf der x-Achse die Produktion der CD8⁺ T-Zellen von TNF- α und auf der y-Achse die Produktion von IFN- γ . Im linken unteren Quadranten jeder Abbildung befindet sich die Zellpopulation ohne Hochregulation der dargestellten Aktivierungsmarker. In den linken oberen und rechten unteren Quadranten sind die CD8⁺ T-Zellen zu sehen, die nur eines der beiden Zytokine exprimiert haben. Im rechten oberen Quadranten sind die IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ CD8⁺ T-Zellen zu sehen. In den jeweiligen Ecken können die prozentualen Verteilungen auf die verschiedenen Gruppen abgelesen werden.

Beim Patienten LR_08 wurden 0,63 % CD8⁺ T-Zellen durch das IVS-Medium aktiviert. Durch die Positivkontrolle CEF-Pool haben 26,7 % der CD8⁺ T-Zellen beide Aktivierungsmarker ausgeschüttet, welches eine deutliche Reaktion darstellt. Wie oben schon erwähnt wurden 23,6 % CD8⁺ T-Zellen durch den KRT-Superpool aktiviert.

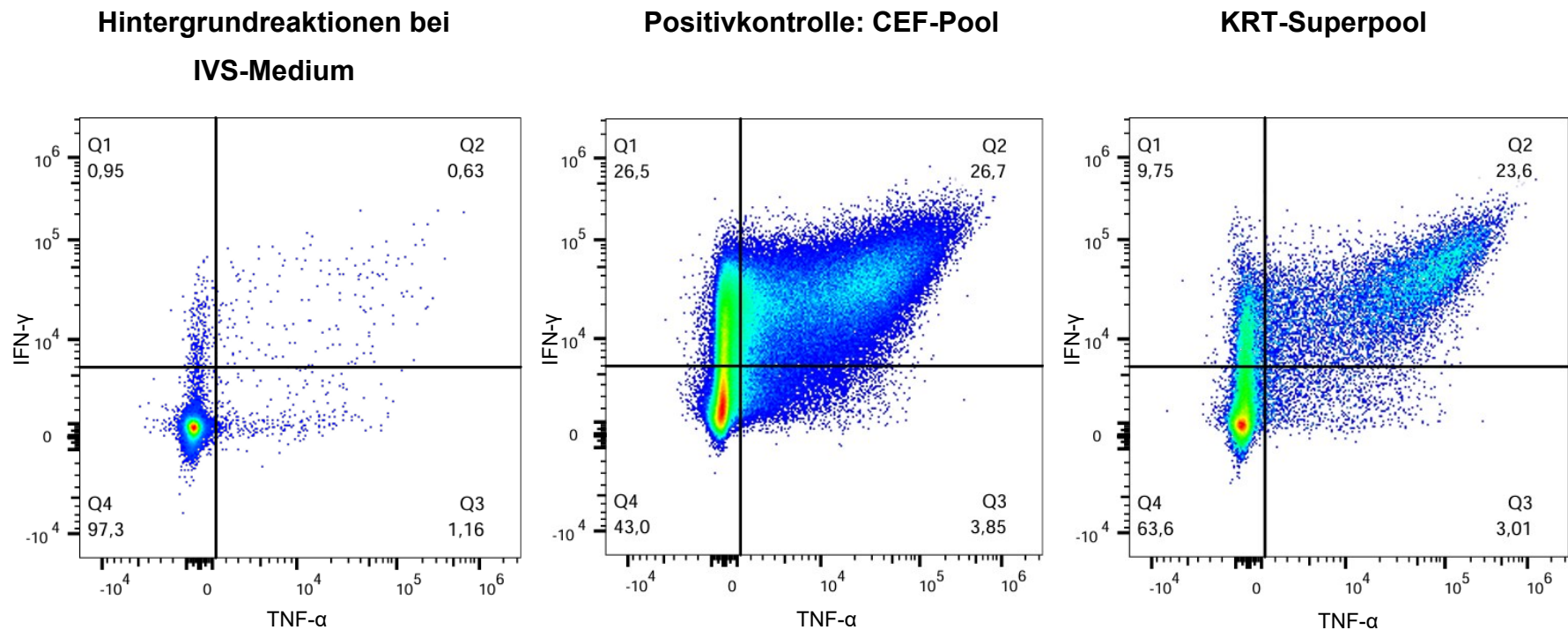


Abbildung 13: Durchflusszytometrie Graphiken der Aktivierung der CD8+ T-Zellen von Patient LR_08 durch den Keratin-Superpool (rechts) inklusive Hintergrundreaktionen bei IVS-Medium (links) und Positivkontrolle CEF-Pool (mittig). Auf der x-Achse ist produziertes TNF- α , auf der y-Achse produziertes IFN- γ aufgetragen. Die IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen sind jeweils im rechten oberen Quadranten jeder Teilabbildung zu finden. Patient LR_08 zeigte eine deutliche Aktivierung von 23,6 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen durch den KRT-Superpool. Die Stimulation mit IVS-Medium mit 0,63 % und die Positivkontrolle CEF-Pool mit 26,7 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen zeigen, dass die Stimulation funktioniert hat.

3.2.1.2 Aktivierung von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis durch Protein-spannende Peptidpools von Keratinen

In Kapitel 3.2.1.1 sind die Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem Keratin-Superpool beschrieben. Hierbei haben die CD8+ T-Zellen von sieben Patienten mit Lichen ruber und einem Patienten mit Psoriasis (PS_03) auf den Keratin-Superpool eine Aktivierung gezeigt. Der Keratin-Superpool besteht aus den gepoolten Peptiden von zehn unterschiedlichen Keratinen. Um herauszufinden, gegen welches genaue Keratin die Reaktion im Keratin-Superpool gerichtet war, wurden in vitro Stimulationen für jedes Keratin als Protein-spannender Peptidpool durchgeführt. Zudem wurde mit dem Aktin-Pool als Negativkontrolle stimuliert. Die Patienten LR_19, LR_20, LR_21, LR_22 und LR_23 wurden im Voraus nicht auf die drei Superpools getestet, sondern lediglich auf die Protein-spannenden Peptidpools der Keratine. Patient LR_10 wurde aus Mangel an genügend Zellen für die in vitro Stimulation lediglich auf Keratin 1, 2, 5, 10 und 14 getestet.

In Abbildung 14 sind die auf Protein-spannende Peptidpools von Keratinen getesteten Patientenproben (x-Achse) und der prozentuale Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen (y-Achse) dargestellt.

Von diesen Patientenproben haben vier der Lichen ruber Proben auf mindestens einen Protein-spannenden Peptidpool reagiert. Patient LR_08 hat auf den Peptidpool aus Keratin 14 mit 7,17 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen reagiert. Auch 2,11 % der CD8+ T-Zellen von Patient LR_13 zeigten durch den Peptidpool aus Keratin 14 eine Aktivierung. Außerdem zeigten sich 3,12 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen von LR_14 auf den Protein-spannenden Peptidpool von Keratin 14. Zudem reagierten 1,02 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen von LR_13 auf Keratin 10. Von LR_10 reagierten 3,27 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen auf Keratin 5, jedoch auch 1,83 % auf die Negativkontrolle Aktin-Pool.

Somit zeigten die CD8+ T-Zellen von drei (LR_08, LR_13, LR_14) der 13 getesteten Patienten eine Aktivierung durch den Protein-spannenden Peptidpool von Keratin 14. Die deutlichste Reaktion gegen Keratin 14 zeigten hier die CD8+ T-Zellen von LR_08.

Von Patient LR_10 reagierten zwar jeweils knapp über 1 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen auf Keratin 1, 10 und 14, jedoch lag der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen beim IVS-Medium bei 0,78 %, weshalb hier keine Aktivierung stattfand. Bei Patient LR_21 lagen ebenfalls Reaktionen über 1 % bei Keratin 1 und 6C vor, jedoch können diese nicht als Aktivierung gewertet werden, wenn man die Werte des IVS-Mediums betrachtet. Das Gleiche gilt für die Reaktion bei LR_20 auf Keratin 6C und LR_24 auf Keratin 10 und 16.

Der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen der restlichen Patientenproben auf Protein-spannende Peptidpools aus Keratinen sind, wie in Abb. 14 zu sehen, unter 1 % und somit nicht als Aktivierung zu werten.

Reaktionen von CD8+ T-Zellen von 12 Patienten mit Lichen ruber und einem Patienten mit Psoriasis auf Protein-spannende Peptidpools aus Keratinen

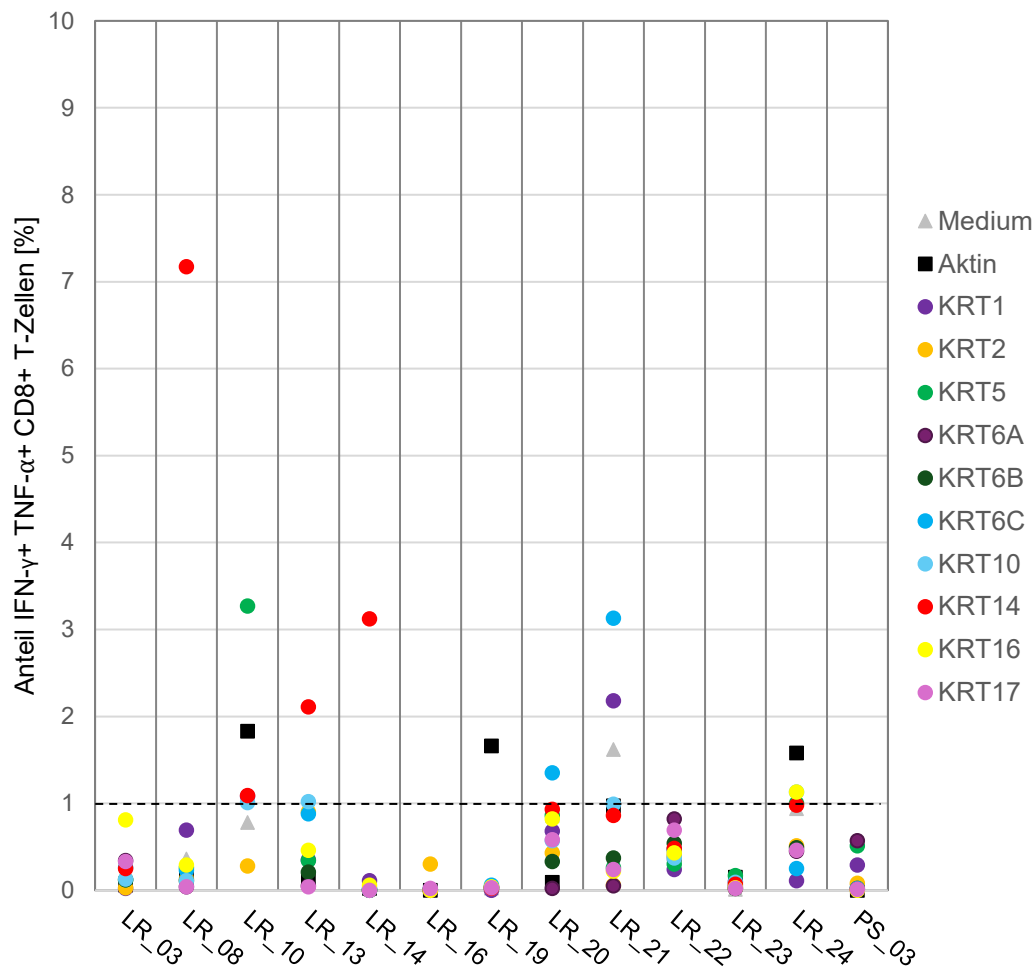


Abbildung 14: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit Protein-spannenden Peptidpools aus Keratinen von PBMCs von zwölf Patienten mit Lichen ruber und einem Patienten mit Psoriasis (PS_03). Die x-Achse zeigt die verschiedenen Patienten, die y-Achse den Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Hilfslinie bei 1 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die jeweiligen Keratinpools sind in verschiedenen Farben dargestellt, das IVS-Medium (Medium) in grau, der Aktin-Pool (Aktin) in schwarz. Die T-Zellen von drei Patienten (LR_08, LR_13, LR_14) zeigten eine Aktivierung durch Keratin 14 (KRT14). Die CD8+ T-Zellen von Patient LR_13 wurden durch Keratin 10 und die von Patient LR_10 durch Keratin 5 aktiviert, jedoch auch durch die Negativkontrolle Aktin-Pool.

3.2.2 Reaktionen von CD8+ T-Zellen auf Zelladhäsionsmoleküle

3.2.2.1 Aktivierung von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis durch den Zelladhäsionsmoleküle-Superpool

Bei den CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber wurden acht durch den ADH-Superpool aktiviert. Ebenfalls reagierten die CD8+ T-Zellen von Patient PS_03 mit Psoriasis auf den ADH-Superpool.

In den Abbildungen 15 und 16 können die Ergebnisse der in vitro Stimulationen mit dem ADH-Superpool eingesehen werden. Die Reaktionen der CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber sind in Abb. 15 dargestellt. Die einzelnen Patienten-IDs sind auf der x-Achse aufgetragen. Der prozentuale Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen, kann auf der y-Achse abgelesen werden. Die Aktivierung durch den ADH-Superpool ist in grün und die Reaktion auf das IVS-Medium in grau zu sehen.

Die CD8+ T-Zellen von acht der 24 Patienten (33,33 %) wurden durch den ADH-Superpool aktiviert, welche in der Graphik hervorgehoben sind.

Durch den ADH-Superpool am stärksten aktiviert wurde die Probe von Patient LR_11 mit 8,49 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Deutlich erkennbar ist auch die Reaktion von LR_24 mit 4,51 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die Reaktionen der anderen sechs Patienten sind unter 3 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen, wobei der Anteil bei Patient LR_08 bei 2,47 % war. Die Patienten mit den IDs LR_05, LR_09, LR_10, LR_14 und LR_27 hatten zwischen 1 % und 2 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen als Reaktion auf den ADH-Superpool. Bei Patient LR_03 war die Aktivierung durch die Negativkontrolle IVS-Medium zu hoch, als dass die 1,15 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen auf den ADH-Superpool als Aktivierung von CD8+ T-Zellen gesehen werden kann. Bei den Patienten LR_25 und LR_29 waren die Reaktionen der CD8+ T-Zellen auf das IVS-Medium sogar stärker als durch die Peptide in dem ADH-Superpool.

Bei allen anderen 16 der 24 Patientenproben (66,67 %) konnten keine aktivierten CD8+ T-Zellen durch den ADH-Superpool festgestellt werden.

Reaktionen von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber auf den ADH-Superpool

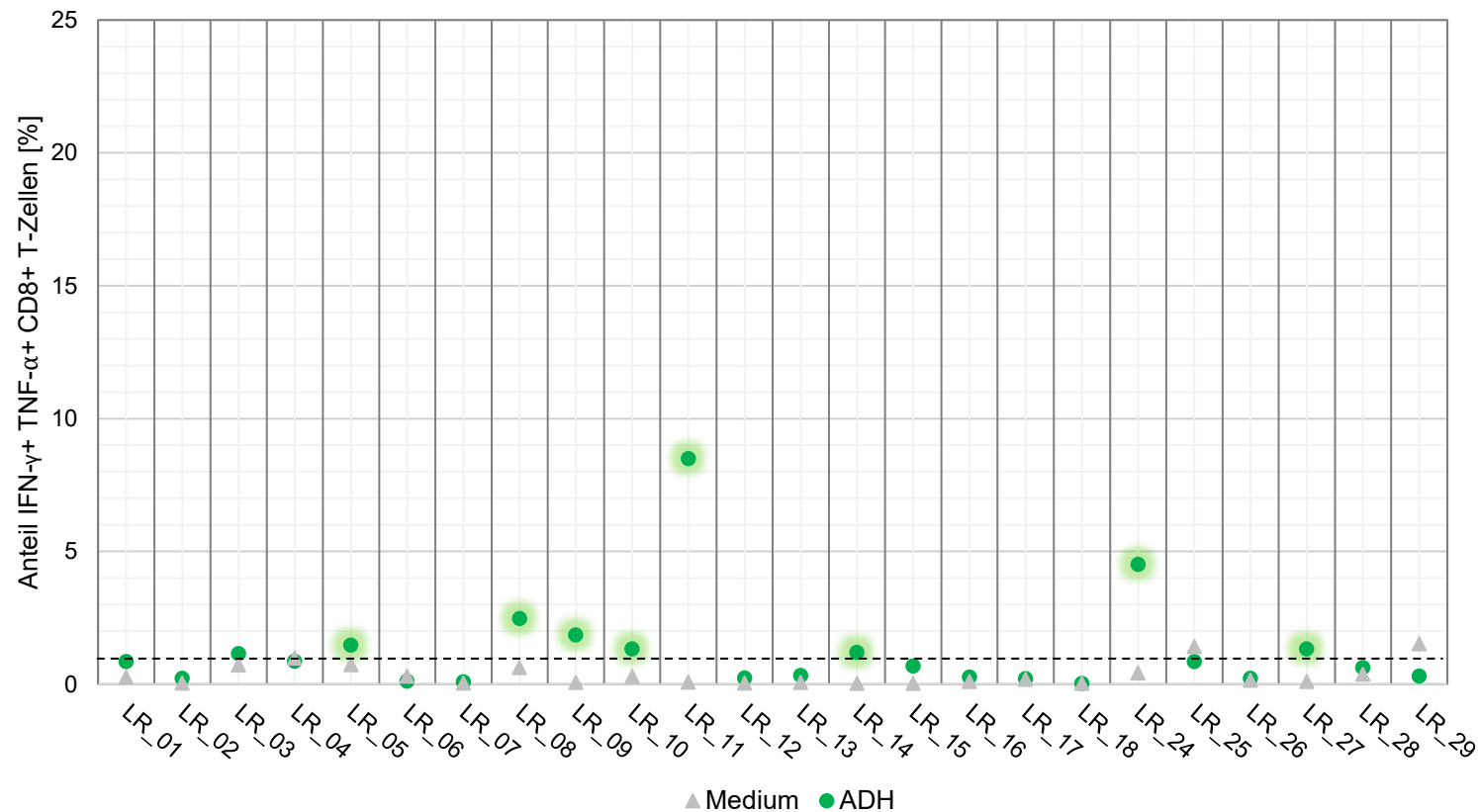


Abbildung 15: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem ADH-Superpool von PBMCs von 24 Patienten mit Lichen ruber. An der x-Achse sind die IDs der Patienten aufgetragen, an der y-Achse kann der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen in Prozent abgelesen werden. Hilfslinie bei 1 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die Werte des ADH-Superpools (ADH, Zelladhäsionsmoleküle) sind grün und die des IVS-Mediums (Medium) in grau dargestellt. Die CD8+ T-Zellen von acht Patientenproben wurden durch den ADH-Superpool aktiviert (Graphikpunkte hervorgehoben).

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Stimulation mit dem ADH-Superpool von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Psoriasis dargestellt. Die sechs Patienten sind auf der x-Achse aufgetragen. Der prozentuale Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen ist an der y-Achse zu sehen. Die Werte des IVS-Mediums sind grau und die Werte für den ADH-Superpool grün dargestellt. Lediglich bei Patient PS_03 konnte eine Aktivierung mit 2,45 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen gefunden werden. Patient PS_05 hat 0,99 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen gehabt und somit nur knapp keine Aktivierung gezeigt. Die anderen vier Patienten PS_01, PS_02, PS_04 und PS_06 haben alle unter 0,15 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen aufgewiesen.

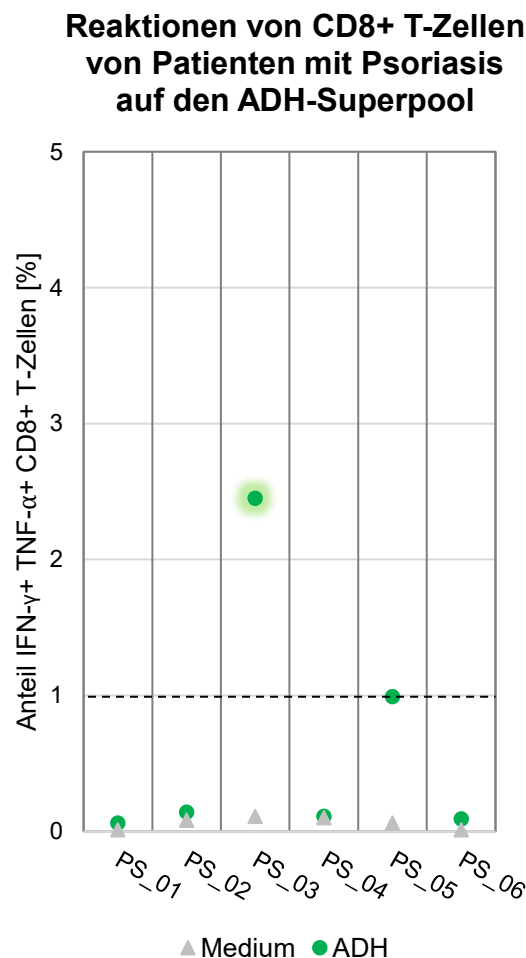


Abbildung 16: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem ADH-Superpool von PBMCs von sechs Patienten mit Psoriasis. Die x-Achse zeigt die sechs Patienten, die y-Achse den Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen in Prozent. Hilfslinie bei 1 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die Werte des ADH-Superpools (ADH, Zelladhäsionsmoleküle) sind in grün zu sehen, die des IVS-Mediums (Medium) in grau. Lediglich Patient PS_03 hatte CD8+ T-Zellen, die aktiviert wurden (Graphikpunkt hervorgehoben).

Nachfolgend sind die Graphiken der Durchflusszytometrie von Patient LR_11 zu sehen, dessen CD8+ T-Zellen die stärkste Aktivierung durch den ADH-Superpool gezeigt haben (s. Abb. 17).

Dargestellt sind rechts das Ergebnis der Stimulation mit dem ADH-Superpool, links des IVS-Mediums und in der Mitte der Positivkontrolle CEF-Pool. Auf der x-Achse ist produziert $\text{TNF-}\alpha$, auf der y-Achse produziert $\text{IFN-}\gamma$ aufgetragen. Der rechte obere Quadrant jeder Teilabbildung zeigt die Zellpopulation der $\text{IFN-}\gamma^+ \text{TNF-}\alpha^+ \text{CD8}^+$ T-Zellen. Die Zellen in der Zellpopulation, die keine der beiden Aktivierungsmarker hochreguliert haben, sind im linken unteren Quadranten zu finden. In den rechten unteren und linken oberen Quadranten sind die Zellen, die nur das jeweilige ihrer Achse entsprechende Zytokin produziert haben. Die Prozentzahlen für jede Gruppe stehen in den Ecken der Quadranten.

Wie schon beschrieben, konnten bei dem Patienten LR_11 8,49 % an $\text{IFN-}\gamma^+ \text{TNF-}\alpha^+ \text{CD8}^+$ T-Zellen gemessen werden. Durch das IVS-Medium wurden gerundet nur 0,08 % der CD8^+ T-Zellen aktiviert. Als Reaktion auf die Positivkontrolle CEF-Pool gab es 32.2 % an $\text{IFN-}\gamma^+ \text{TNF-}\alpha^+ \text{CD8}^+$ T-Zellen.

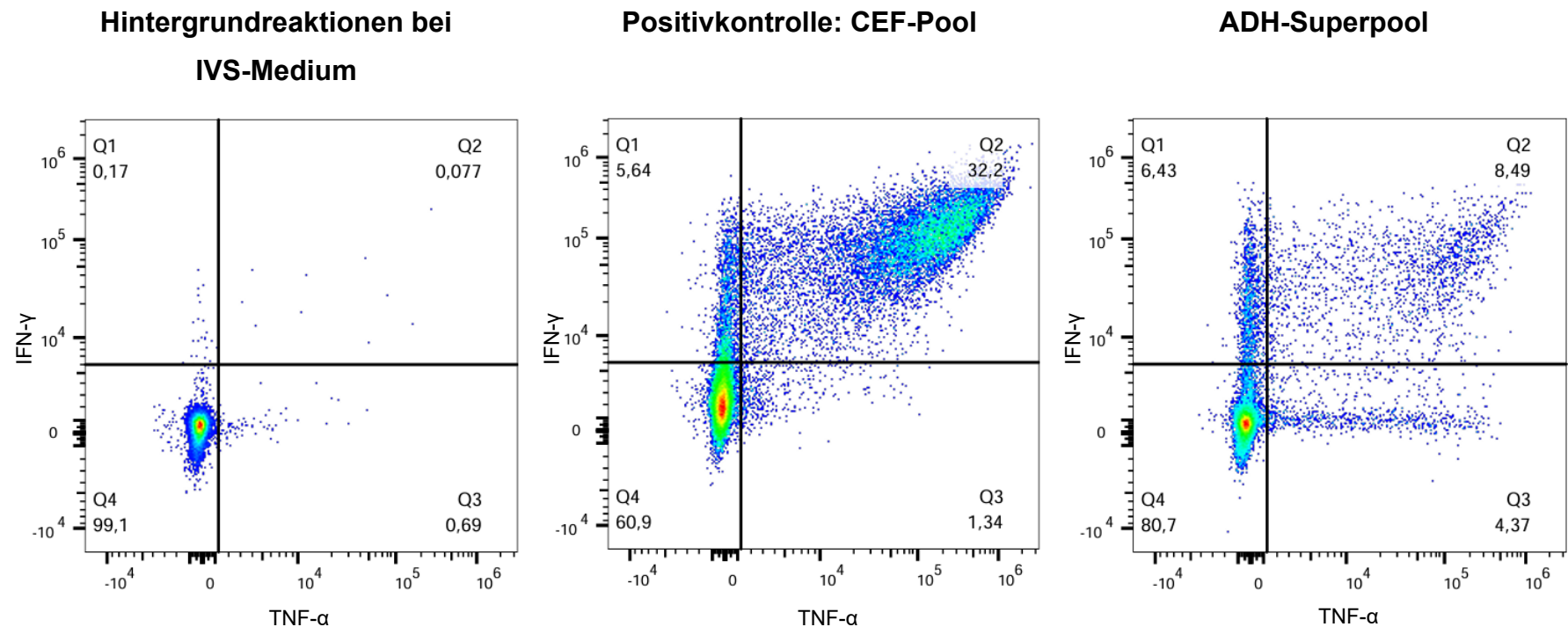


Abbildung 17: Durchflusszytometrie Graphiken der Aktivierung der CD8+ T-Zellen von Patient LR_11 durch den ADH-Superpool (rechts), IVS-Medium (links) und durch die Positivkontrolle CEF-Pool (mittig). Auf der x-Achse ist produziertes TNF- α , auf der y-Achse produziertes IFN- γ aufgetragen. Die IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen (jeweils rechter oberer Quadrant) hatten beim ADH-Superpool einen Anteil von 8,49 %. Beim IVS-Medium waren es 0,08 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen und bei der Positivkontrolle CEF-Pool waren es 32,2 %.

3.2.2.2 Aktivierung von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis durch Protein-spannende Peptidpools von Zelladhäsionsmolekülen

In Kapitel 3.2.2.1 ist nachvollziehbar, dass die CD8+ T-Zellen von acht Patienten mit Lichen ruber (LR_05, LR_08, LR_09, LR_10, LR_11, LR_14, LR_24, LR_27) und einem Patienten mit Psoriasis (PS_03) auf den ADH-Superpool eine Aktivierung gezeigt haben. In dem ADH-Superpool enthalten waren Protein-spannende Peptidpools der vier Zelladhäsionsmoleküle Desmoglein 1 (Dsg 1), Desmoglein 3 (Dsg 3), Desmocollin 3 (Dsc 3) und BP180. Im nächsten Schritt wurden die Patientenproben, die auf den ADH-Superpool reagiert haben, einzeln auf die Protein-spannenden Peptidpools der vier Zelladhäsionsmoleküle getestet. Es konnten nur sieben Patienten getestet werden, da bei LR_08 und LR_14 nicht genügend Zellen für eine weitere in vitro Stimulation vorhanden waren.

Die Ergebnisse der in vitro Stimulation mit den Protein-spannenden Peptidpools von Zelladhäsionsmolekülen sind in Abbildung 18 zu sehen. Hierbei sind die Patientenproben auf der x-Achse und der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen auf der y-Achse aufgetragen.

Die PBMCs der drei Patienten LR_09, LR_10 und LR_24 haben jeweils auf zwei der vier Protein-spannenden Peptidpools reagiert. Hierbei haben alle drei auf den Peptidpool von Dsg 3 eine Aktivierung gezeigt, LR_09 mit 2,06 %, LR_10 mit 1,65 % und LR_24 mit 6,38 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Zudem zeigten die CD8+ T-Zellen von LR_09 mit 1,29 % und LR_24 mit 2,48 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen eine Aktivierung durch den Protein-spannenden Peptidpool von BP180. Die CD8+ T-Zellen von Patient LR_10 hatten 1,6 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen als Reaktion auf den Peptidpool von Dsg 1. Die stärkste Reaktion zeigten die IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen von Patient PS_03 mit Psoriasis mit 9,6 % auf den Protein-spannenden Peptidpool von Dsc 3. Patient LR_27 hatte zwar auch 1,33 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen, jedoch auch bei dem IVS-Medium 1,11 %, weshalb man hier nicht von einer Aktivierung sprechen kann. Zudem fand eine Reaktion auf die Negativkontrolle Aktin-Pool bei LR_27 statt.

Die Reaktion der CD8+ T-Zellen durch die Negativkontrolle Aktin-Pool scheint bei LR_24 auch hoch zu sein (1,58 %), jedoch ist hier das Kriterium doppelt so viele IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen als beim Medium zu haben, nicht erfüllt (Medium bei LR_24: 0,94 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen). Bei den Patienten LR_05 und LR_11 konnte keine Aktivierung nachgewiesen werden.

Reaktionen von CD8+ T-Zellen von sechs Patienten mit Lichen ruber und einem Patienten mit Psoriasis auf Protein-spannende Peptidpools aus Zelladhäsionsmolekülen

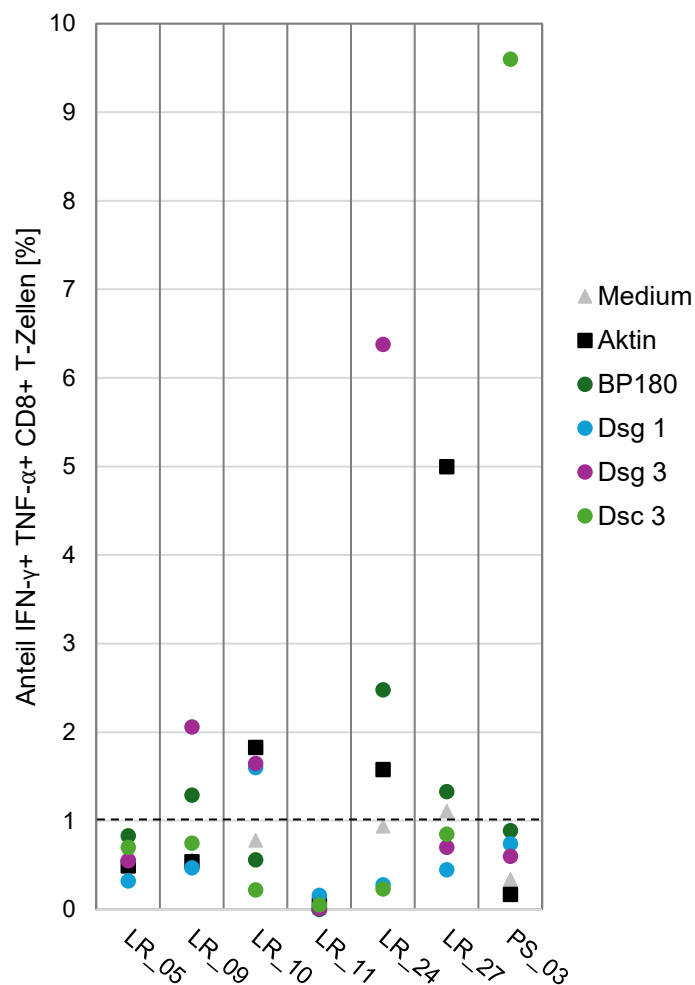


Abbildung 18: Ergebnisse der *in vitro* Stimulation mit Protein-spannenden Peptidpools aus den vier Zelladhäsionsmolekülen von PBMCs von sechs Patienten mit Lichen ruber und einem Patienten mit Psoriasis (PS_03). Auf der x-Achse sind die getesteten Patientenproben, auf der y-Achse der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen aufgetragen. Hilfslinie bei 1 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die jeweiligen Peptidpools sind in verschiedenen Farben dargestellt, die Ergebnisse des IVS-Mediums (Medium) sind in grau, des Aktin-Pools (Aktin, Negativkontrolle) in schwarz. Bei drei Patienten mit Lichen ruber (LR_09, LR_24) gab es eine Aktivierung durch Desmoglein 3 (Dsg 3) und bei zwei (LR_09, LR_24) auf BP180. Bei LR_10 zeigte sich eine Reaktion auf Desmoglein 3 und 1 (Dsg 1), jedoch auch auf den Aktin-Pool. Die CD8+ T-Zellen von Patient PS_03 mit Psoriasis zeigten eine Aktivierung durch Desmocollin 3 (Dsc 3).

3.2.3 Reaktionen von CD8+ T-Zellen auf Psoriasis-Antigene

3.2.3.1 Aktivierung von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber durch den Psoriasis-Superpool, keine Aktivierung von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Psoriasis durch den Psoriasis-Superpool

Durch die in vitro Stimulation mit dem PSO-Superpool konnte bei acht Patienten mit Lichen ruber eine Aktivierung von CD8+ T-Zellen beobachtet werden. Bei keinem Patienten mit Psoriasis waren Aktivierungen erkennbar.

Die Reaktionen der CD8+ T-Zellen auf den PSO-Superpool von Patienten mit Lichen ruber sind in Abb. 19 dargestellt. Aufgetragen sind auf der x-Achse die Patienten und auf der y-Achse der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen in Prozent. Die Ergebnisse bei dem IVS-Medium sind in grau und bei dem PSO-Superpool in blau abgebildet.

Auf den PSO-Superpool zeigten die CD8+ T-Zellen von acht der 24 Patienten (33,33 %) eine Aktivierung, welches in der Abbildung 19 hervorgehoben zu sehen ist.

Als stärkste Reaktion auf den PSO-Superpool können die IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen von Patient LR_07 mit 8,58 % beobachtet werden. Über 5 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen wiesen auch Patient LR_02 mit 6,19 % und Patient LR_17 mit 5,47 % auf. Die restlichen Patientenproben zeigten Aktivierungen von unter 5 %. Hierbei hatten Patient LR_16 mit 4,13 % und Patient LR_28 mit 3,86 % noch den höchsten Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Bei um die 2 % lagen die Reaktion von den Patienten LR_04 (2,15 %) und LR_08 (1,98 %). Die geringste Aktivierung zeigten die CD8+ T-Zellen von Patient LR_26 mit 1,09 %.

Die CD8+ T-Zellen der anderen 16 Patienten (66,67 %) wiesen keine Aktivierung durch den PSO-Superpool auf.

Reaktionen von CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber auf den PSO-Superpool

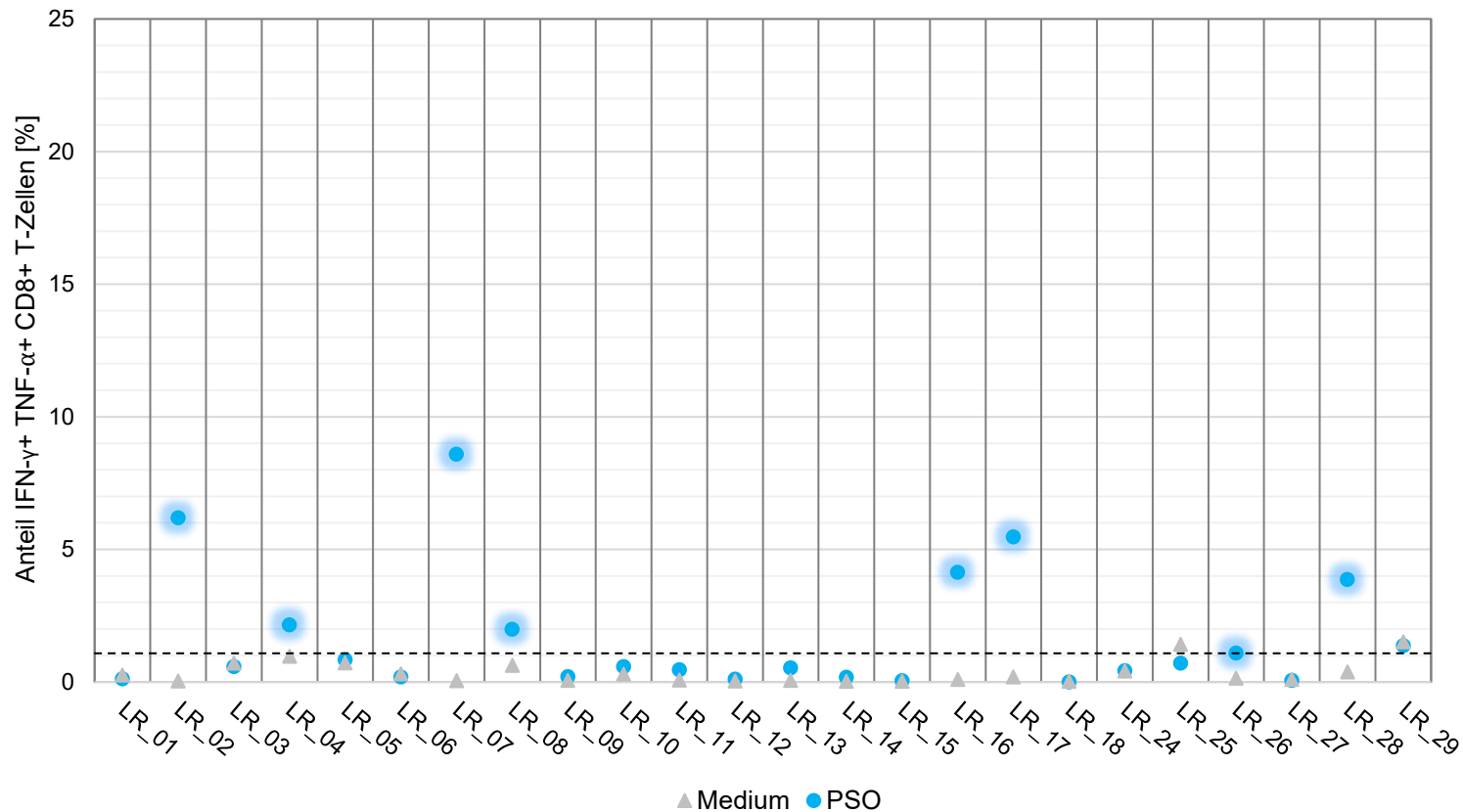


Abbildung 19: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem PSO-Superpool von 24 Patienten mit Lichen ruber. Die Patienten-IDs sind auf der x-Achse, der prozentuale Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen auf der y-Achse aufgetragen. Hilfslinie bei 1 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. In grau ist das IVS-Medium (Medium) und in blau der PSO-Superpool (PSO, Psoriasis) zu sehen. Acht Patienten zeigten CD8+ T-Zellen, die durch den PSO-Superpool aktiviert wurden (Graphikpunkte hervorgehoben).

Die Ergebnisse der Stimulation der CD8+ T-Zellen von Patienten mit Psoriasis auf den PSO-Superpool sind in Abbildung 20 abgebildet. Der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen ist in Prozent auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind die Patienten aufgetragen. In grau ist das IVS-Medium, während die Reaktionen auf den PSO-Superpool in blau zu sehen sind.

Bei allen sechs Patienten mit Psoriasis wurden die CD8+ T-Zellen nicht durch den PSO-Superpool aktiviert. Keine Reaktion ging über 0,4 % (PS_03) an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen hinaus.

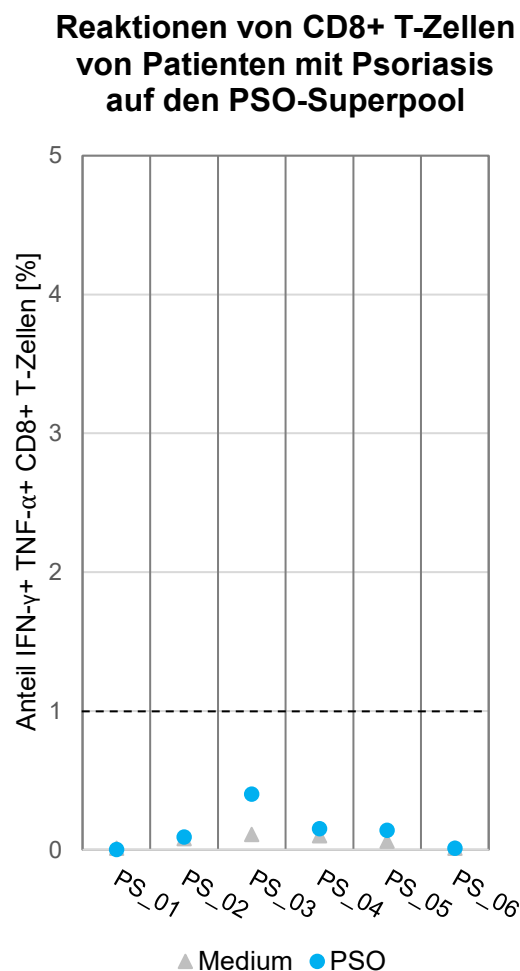


Abbildung 20: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit dem PSO-Superpool von PBMCs von sechs Patienten mit Psoriasis. Die Patienten sind auf der x-Achse und der prozentuale Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen auf der y-Achse dargestellt. Hilfslinie bei 1 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die Werte des IVS-Mediums (Medium) sind grau und die des PSO-Superpools (PSO, Psoriasis) blau illustriert. Kein Patient mit Psoriasis hatte CD8+ T-Zellen mit einer Aktivierung durch den PSO-Superpool.

In der folgenden Abbildung 21 sind die Graphiken der Durchflusszytometrie von Patient LR_07 auf den PSO-Superpool dargestellt, welcher die stärkste Reaktion zeigte. Zu sehen sind links das Ergebnis des IVS-Mediums, mittig die Positivkontrolle CEF-Pool und rechts die Graphik des PSO-Superpools. Die produzierten Aktivierungsmarker TNF- α und IFN- γ sind auf der x- und y-Achse gegeneinander aufgetragen. In jeder Teilabbildung sind die Zellpopulationen der IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen im rechten oberen Quadranten gezeigt. Im linken oberen und rechten unteren Quadranten sind die Zellpopulationen von CD8+ T-Zellen zu sehen, die entweder TNF- α oder IFN- γ produzierten. Keine der beiden Aktivierungsmarker konnten bei den Zellen im linken unteren Quadranten nachgewiesen werden. Jeweils in den Ecken der Quadranten können die entsprechenden prozentualen Anteile an CD8+ T-Zellen abgelesen werden.

Die IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen von Patient LR_07 zeigten mit 8,58 % den höchsten Anteil als Reaktion auf den PSO-Superpool. Bei dem IVS-Medium waren 0,05 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen und bei der Positivkontrolle CEF-Pool 2,03 %.

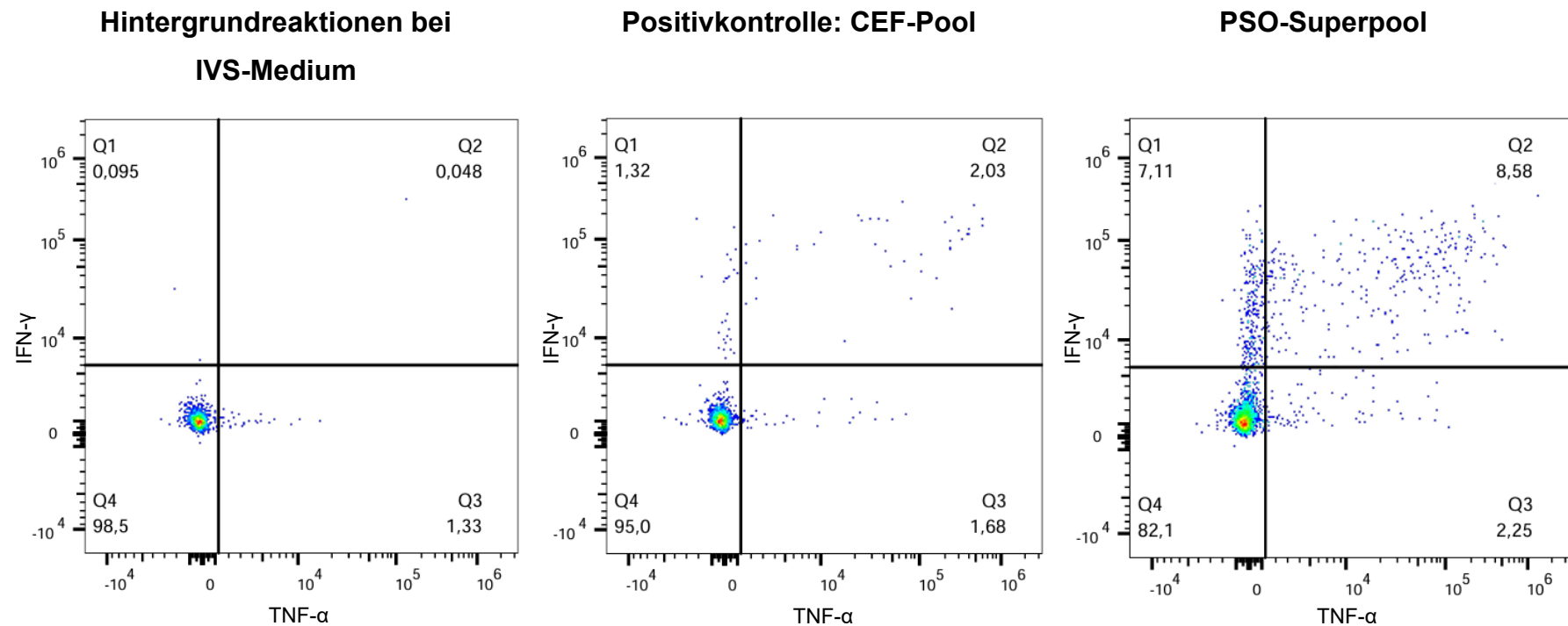


Abbildung 21: Durchflusszytometrie Graphiken der Aktivierung der CD8+ T-Zellen von Patient LR_07 auf den PSO-Superpool (rechts), auf das IVS-Medium (links) und auf die Positivkontrolle CEF-Pool (mittig). Produzierte Aktivierungsmarker TNF- α und IFN- γ sind auf der x- und y-Achse gegeneinander aufgetragen. Die IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen (jeweils rechter oberer Quadrant) hatten bei dem IVS-Medium einen Anteil von 0,05 %, bei der Positivkontrolle CEF-Pool waren es 2,03 %. 8,58 % CD8+ T-Zellen wurden durch den PSO-Superpool aktiviert.

3.2.3.2 CD8+ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber reagieren nicht auf Protein-spannende Peptidpools von Psoriasis-Antigenen

Wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben, haben die CD8+ T-Zellen von acht Patienten mit Lichen ruber (LR_02, LR_04, LR_07, LR_08, LR_16, LR_17, LR_26, LR_28) eine Aktivierung durch den PSO-Superpool gezeigt. Bei den Patienten mit Psoriasis ließ sich keine Reaktion auf den PSO-Superpool nachweisen. In dem Pool enthalten waren die Protein-spannenden Peptidpools von LL-37 und ADAMTSL5. Im Anschluss wurden sieben der auf den PSO-Superpool reagierenden Patientenproben auf diese beiden Peptidpools einzeln getestet. Bei Patient LR_08 waren nicht mehr genügend Zellen für eine erneute in vitro Stimulation vorhanden.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der in vitro Stimulation mit den Protein-spannenden Peptidpools von LL-37 in orange und ADAMTSL5 in grün zu sehen. Das IVS-Medium ist in grau und der Aktin-Pool in schwarz dargestellt. Der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen ist auf der y-Achse aufgetragen, wobei die Patienten-IDs auf der x-Achse abgelesen werden können.

Bei keinem der sieben Patienten fand eine Aktivierung mit über 1 % an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen durch einen der Protein-spannenden Peptidpools von LL-37 und ADAMTSL5 statt. Die IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen von LR_04 hatten beim Protein-spannenden Peptidpool von ADAMTSL5 einen Anteil von 1,14 %, jedoch im Vergleich einen zu hohen Anteil beim IVS-Medium (0,85 %).

Reaktionen von CD8+ T-Zellen bei sieben Patienten mit Lichen ruber auf Protein-spannende Peptidpools aus PSO-Antigenen

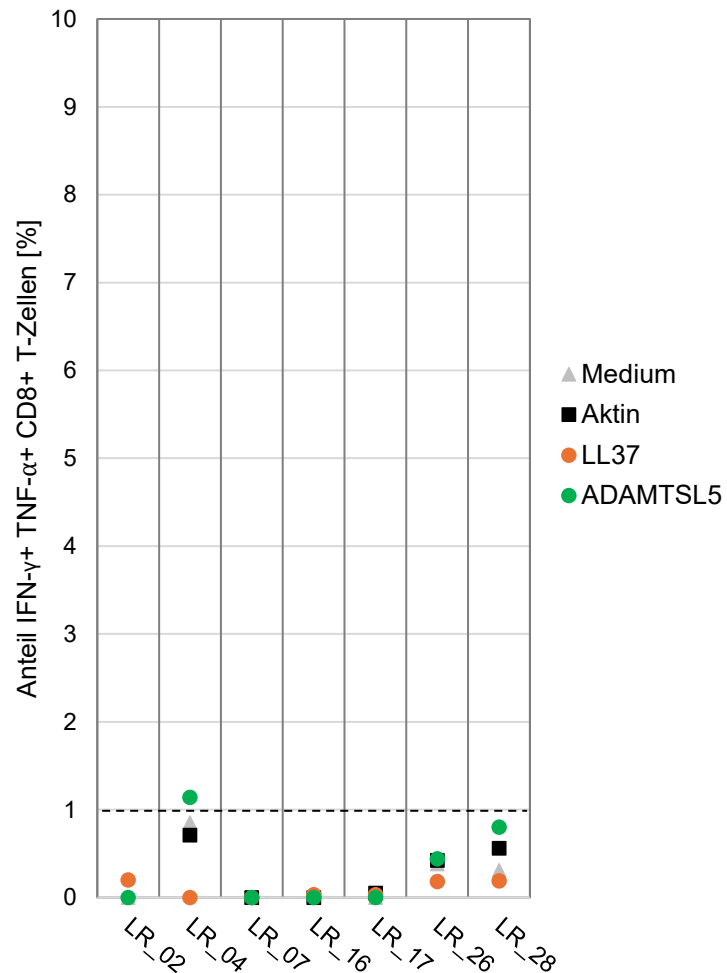


Abbildung 22: Ergebnisse der in vitro Stimulation mit den Protein-spannenden Peptidpools aus LL-37 und ADAMTSL5 von sieben Patienten mit Lichen ruber. Die Patienten IDs sind auf der x-Achse und der Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen auf der y-Achse dargestellt. Hilfslinie bei 1 % IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen. Die jeweiligen Peptidpools sind in verschiedenen Farben dargestellt, die Ergebnisse des IVS-Mediums (Medium) in grau, des Aktin-Pools (Aktin) in schwarz. Es konnte keine Aktivierung von CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Lichen ruber und Psoriasis sind chronisch entzündliche Hauterkrankungen, die gemeinsam mit anderen Hauterkrankungen unter dem Begriff inflammatorische Dermatosen zusammengefasst werden.

Pathogenetisch spielen bei beiden Erkrankungen autoreaktive T-Zellen eine Rolle. Beim Lichen ruber finden sich vor allem CD8⁺ T-Zellen, die in die basale Haut übergehen und zu einer Interface Dermatitis führen (Boch et al., 2021). Bei der Psoriasis hingegen sind sowohl CD8⁺ T-Zellen, als auch verschiedene CD4⁺ T-Zell-Subtypen beteiligt (Nikaein et al., 1991). Der genaue Pathomechanismus beider Erkrankungen ist noch nicht vollständig verstanden. Unter anderem sind die Antigene, auf welche die T-Zellen reagieren, v.a. die der CD8⁺ T-Zellen beim Lichen ruber, weitestgehend unbekannt. Einige Autoantigene sind bereits beschrieben. So konnten Schmidt et al. bei Patienten mit Lichen ruber die Zelladhäsionsmoleküle Dsg 3 und BP180 als Antigene von CD4⁺ T-Helferzellen bestimmen (Schmidt et al., 2018). Bei Patienten mit Psoriasis sind autoreaktive CD8⁺ T-Zellen gegen LL-37, ADAMTSL5 und Keratin 17 bekannt (Arakawa et al., 2015; Johnston et al., 2004; Lande et al., 2014).

Beide Erkrankungen sollten vor allem, aber nicht nur, aufgrund des Leidensdrucks der Patienten therapiert werden. Der mukosale Lichen ruber kann auch maligne entarten und ist oft schwer zu behandeln. Das genaue Wissen um die oben beschriebenen Autoantigene trägt dazu bei, die Erkrankungen besser zu verstehen und dadurch auch andere, gegebenenfalls spezifischere, Therapieoptionen zu entwickeln.

Das Ziel dieser Arbeit war zum einen die bereits definierten Autoantigene beider Erkrankungen zu bestätigen. Zum anderen sollten mögliche andere Autoantigene von CD8⁺ T-Zellen ermittelt werden.

Hierzu wurden aus Blut von Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis PBMCs isoliert und mit diesen T-Zell-Stimulations-Assays mit den bereits beschriebenen und noch nicht beschriebenen, aber in Frage kommenden, Autoantigenen

durchgeführt. Die bereits bekannten Autoantigene bei Lichen ruber (Dsg 3, BP180) und bei Psoriasis (LL-37, ADAMTSL5, Keratin 17) wurden auch bei der jeweils anderen Erkrankung getestet. Ergänzt wurden die beiden Zelladhäsionsmoleküle Desmoglein 1 und Desmocollin 3, welche wie das Desmoglein 3 auch Teile der Desmosomen darstellen (Najor, 2018). Wie bereits beschrieben besitzen Keratine ein hohes Potential besitzen, zu den noch unbekannten Autoantigenen von Lichen ruber und Psoriasis zu gehören. Aufgrund dessen wurden die PBMCs von Patienten beider Erkrankungen mit neun weiteren Keratinen stimuliert (Keratin 1, 2, 5, 6A, 6B, 6C, 10, 14, 16).

Um unspezifische Hintergrundreaktionen zu erkennen, wurde in-vitro-Stimulations-Kulturmedium (IVS-Medium) verwendet. Diese Werte dienten als Referenzgrundlage um eine Aktivierung spezifischer T-Zellen bei Hinzugabe von Peptidpools festzustellen. Die Daten von beispielsweise LR_25 und LR_29 zeigen, dass es wichtig ist, die Hintergrundreaktionen von IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen bei IVS-Medium zu beachten. Bei diesen ist die Rate an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen im IVS-Medium so hoch, dass die erhöhten Werte an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen bei den Stimulationen mit den Superpools die Kriterien einer Aktivierung (s. Kap. 2.2.5.2) nicht erfüllten. Eine Aktivierung würde ohne Beachtung der Hintergrundreaktionen eine falsch positive unspezifische Aktivierung bedeuten.

Als Negativkontrolle wurde ein Aktin-Pool verwendet. Aktin ist ein im menschlichen Körper weit verbreitetes körpereigenes Protein, welches im Normalfall nicht zu einer Aktivierung von T-Zellen führt (Dominguez & Holmes, 2011). Als Positivkontrolle wurde ein CEF-Pool verwendet. In diesem enthalten sind 23 Peptide des Humanen Zytomegalievirus (HCMV), des Epstein-Barr-Virus (EBV) und des Influenza A-Virus. Dieser Pool wurde verwendet, da die genannten Viren eine hohe Verbreitung in der Bevölkerung aufweisen und deswegen die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass die Patienten diesen Viren im Laufe ihres Lebens bereits ausgesetzt waren (Hecker et al., 2004; Javanian et al., 2021; Karrer & Nadal, 2014). Das bedeutet, dass die T-Zellen im Blut der Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einem dieser Viren schon einmal in

Kontakt waren, und deswegen bei den in vitro Versuchen aktiviert werden können.

Der Fokus der Auswertung wurde auf die CD8+ T-Zellen gelegt. Grund hierfür ist, dass beim Lichen ruber vor allem CD8+ T-Zellen in Hautläsionen beobachtet werden (Boch et al., 2021). Bei der Psoriasis ist histologisch auch ein Infiltrat von CD8+ T-Zellen zu beobachten (Nikaein et al., 1991). Zwar sind bei der Psoriasis auch CD4+ T-Zellen zum großen Teil beteiligt, jedoch wurden Autoantigene für CD8+ T-Zellen beschrieben (Arakawa et al., 2015; Johnston et al., 2004; Lande et al., 2014). Zudem ist bekannt, dass der Genotyp HLA-C*06 ein genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer Psoriasis darstellt. Dieses Gen kodiert für ein HLA Klasse I-Molekül (Humanes Leukozyten Antigen Klasse I-Molekül), welches mit CD8+ T-Zellen interagiert (Nair et al., 2006). CD8+ T-Zellen erkennen Peptide, die auf MHC I-Molekülen präsentiert werden. Bei diesen auf MHC I-Molekülen präsentierten Peptiden handelt es sich um intrazelluläre Moleküle, beispielsweise zelleigene, oder aber auch intrazelluläre Virusproteine (Hewitt, 2003). Reagieren CD8+ T-Zellen auf dort präsentierte zelleigene Moleküle mit einer Immunabwehrreaktion, kann man von einer Autoreaktivität sprechen. Die eingesetzte Positivkontrolle CEF-Pool mit verschiedenen Virusproteinen kann deshalb auch als Positivkontrolle verwendet werden.

Aktivierte CD8+ T-Zellen sekretieren IFN- γ und TNF- α . Diese beiden Signalmoleküle wurden als Aktivierungsmarker verwendet. In dieser Arbeit galten die T-Zellen als aktiviert, wenn sie zwei Kriterien erfüllten. Einerseits mussten im Vergleich zum IVS-Medium, in dem unspezifische Hintergrundreaktionen ablaufen, mindestens doppelt so viele CD8+ T-Zellen beide Signalmoleküle ausschütten. Andererseits sollte der Anteil der IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen bei mindestens 1 % liegen.

Insgesamt wurden die Proben von 29 Patienten mit Lichen ruber und sechs Patienten mit Psoriasis in die Experimente eingeschlossen.

Allgemein zeigte sich, dass die in vitro Stimulationen der T-Zellen mit den Peptidpools funktioniert haben. Die Positivkontrolle CEF-Pool hat in ungefähr

92 % der Stimulationen eine deutliche Aktivierung der CD8+ T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle der Hintergrundreaktionen mit IVS-Medium gezeigt. Bei zwei Patientenproben (LR_29, LR_23) war keine deutliche Reaktion im CEF-Pool erkennbar. Möglich ist, dass diese Patienten im Laufe ihres Lebens noch keinen Kontakt zu den im CEF-Pool enthaltenen Viren hatten, und somit keine CD8+ T-Zellen aus ihrem Blut aktiviert werden konnten. Bei LR_04 und LR_08 konnten in der Stimulation mit den Superpools deutliche Aktivierungen durch den CEF-Pool nachgewiesen werden. Aus unerklärlichen Gründen war bei der nachfolgenden Stimulation mit den Protein-spannenden Peptidpools keine deutliche Aktivierung auf den CEF-Pool erkennbar.

Eine Aktivierung von IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen durch mindestens einen der Peptid-Superpools konnte bei 17 Lichen ruber Patientenproben (59 %) und bei einer Psoriasis Patientenprobe (17 %) nachgewiesen werden. Nachfolgend wurden die IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen von sechs Lichen ruber Patientenproben (21 %) und einer Psoriasis Patientenprobe (17 %) durch mindestens einen entsprechenden Protein-spannenden Peptidpool aktiviert.

4.1 Aktivierung durch Peptidpools von Keratinen

Auffällig ist die Aktivierung von drei Lichen ruber Patientenproben (10 %) auf den Protein-spannenden Peptidpool von Keratin 14 (LR_08, LR_13, LR_14). Diese ist passend zu den Entdeckungen von Wei et al. Von ihnen untersuchte Lichen ruber Proben zeigten einen Verlust von Keratin 14 in basalen Keratinozyten. Sie schlussfolgerten, dass diese reduzierte Keratin 14 Expression auf einen Untergang von Keratin 14-exprimierenden basalen Keratinozyten zurückzuführen ist (Wei et al., 2016). Dieser Untergang hängt vermutlich mit den CD8+ T-Zellen, welche beim Lichen ruber in direkter Nähe zu den zugrunde gegangenen Keratinozyten gefunden wurden, zusammen (Roopashree et al., 2010).

Allerdings wurde der Keratin 14 Verlust in basalen Keratinozyten auch bei Proben der autoimmunen Hauterkrankungen Lupus erythematoses, Graft-versus-Host-Erkrankung und Dermatomyositis, welche alle eine Interface-Dermatitis erzeugen, festgestellt. Es wurden auch Keratin 14-positiven Bodies in der Nähe der dermoepidermalen Junktionszone gefundenen, welche Überreste von zu Grunde gegangenen Keratin 14-exprimierenden Keratinozyten darstellten (Wei et al., 2016). Diese Veränderungen konnten Wie et al. bei der Psoriasis und bei gesunden Probanden nicht feststellen, was mit den Ergebnissen, dass die hier verwendeten Psoriasis Proben keine Aktivierung durch Keratin 14 aufwiesen, übereinstimmt. Außerdem wurde ein Verlust von Keratin 14 in den Haarfollikeln von Patienten mit Lichen ruber gezeigt (Wei et al., 2016). Hierzu passt, dass Patient LR_14, welcher auch auf Keratin 14 IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen zeigte, einen Befall der Haarfollikel aufwies. Der Verlust der Keratin 14 Expression in Haarfollikeln wurde aber auch bei Proben der Erkrankung Lupus erythematoses festgestellt, jedoch nicht bei gesunden Probanden oder anderen getesteten autoimmunen Hauterkrankungen (Wei et al., 2016).

Zudem sind Lichen ruber-ähnliche Läsionen eine Nebenwirkung von Immuncheckpoint-Inhibitoren bei der Therapie von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Geisler et al., 2020). Berner et. al. untersuchten daraufhin einen Zusammenhang von T-Zell-Antigenen zwischen NSCLC-Tumorgewebe und Haut. Ein Patient zeigte hierbei auch IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen spezifisch für Keratin 14, was die Ähnlichkeit zwischen Lichen ruber und Lichen ruber-ähnlichen Läsionen erklären kann (Berner et al., 2019). Interessant ist hierbei das übereinstimmende Ergebnis, da in dieser Arbeit dasselbe Versuchsprotokoll der in vitro Stimulation humaner PBMCs durchgeführt wurde.

Aufgrund der Aktivierung der drei Lichen ruber Patientenproben durch Keratin 14, kann Keratin 14 als potentiell Autoantigen für CD8+ T-Zellen bei Lichen ruber vermutet werden. Allerdings ist fraglich, ob Keratin 14 spezifisch als Autoantigen für eine Erkrankung gesehen werden kann, da es bei vielen inflammatorischen Hauterkrankungen eine Rolle zu spielen scheint (Huter et al., 2010; Wei et al., 2016). Beispielsweise ist es bei verschiedenen autoimmunen Hauterkrankungen

in höheren Schichten der Haut überexprimiert, wie z.B. auch bei der Psoriasis (Candi et al., 2002; Wei et al., 2016).

Es stellt sich die Frage, weshalb die CD8⁺ T-Zellen genau dieser drei Patientenproben auf das Keratin 14 reagiert haben, und alle anderen nicht. Die erhobenen Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht, Art und Dauer der Erkrankung, und Vortherapien lassen keine Rückschlüsse hierfür zu. Gemeint ist, dass es keine erhobenen Daten dieser drei Patienten gibt, die sich im Vergleich zu den anderen unterscheiden. Daher könnten andere Faktoren eine Rolle spielen, wie beispielsweise der HLA-Typ der Patienten (Lowe et al., 1976; Popovska et al., 2020).

Die Probe von LR_13 zeigte neben der Aktivierung durch den Protein-spannenden Peptidpool von Keratin 14 eine Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen durch Keratin 10. Keratin 10 ist in der Literatur nicht als Autoantigen von CD8⁺ T-Zellen bei Lichen ruber vorbeschrieben. Deshalb wurde hier möglicherweise ein neues potentiell Autoantigen für CD8⁺ T-Zellen bei Lichen ruber identifiziert. Da die Aktivierung aber nur halb so hoch im Vergleich zu der auf Keratin 14 war, und sonst keine der Patientenproben durch den Peptidpool von Keratin 10 aktiviert wurde, müssten weitere Experimente das Keratin 10 als potentiell Autoantigen verfolgen, um dies zu bestätigen.

Eine eindeutige Aktivierung durch Keratin 5 zeigten die IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ CD8⁺ T-Zellen von LR_10. Allerdings war hier auch eine klare Aktivierung durch die Negativkontrolle Aktin-Pool sichtbar, wodurch die Reaktion nicht als positiv gewertet werden kann. Keratin 5 ist grundsätzlich als Autoantigen der zytotoxischen T-Zellen bei Lichen ruber denkbar, da es mit Keratin 14 ein Dimer in den Keratinozyten der Basalzellschicht der Haut bildet (Byrne et al., 1994). Da beim Lichen ruber vermutet wird, dass die basalen Keratinozyten zerstört werden, könnte Keratin 5 aufgrund seiner basalen Lokalisation ein Antigen der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen darstellen (Wei et al., 2016). Das wurde allerdings wie das oben erwähnte Keratin 10 in der Literatur nicht vorbeschrieben, sodass hier ein Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeitsgruppen nicht möglich ist.

Hierzu müssten demnach noch weitere Experimente folgen, um das Keratin 5 als potentiell Autoantigen zu identifizieren.

Somit konnte in diesen Experimenten Keratin 14 als mögliches Autoantigen für CD8⁺ T-Zellen von Patienten mit Lichen ruber identifiziert werden. Keratin 10 stellt möglicherweise auch ein noch unentdecktes Autoantigen dar. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Keratine 1, 2, 6A, 6B, 6C, 16 und 17 konnten nicht als Autoantigene für IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ CD8⁺ T-Zellen bei Lichen ruber ermittelt werden.

Ebenfalls konnte bei Patientenproben von Psoriasis weder das bereits beschriebene Keratin 17, noch ein anderes Keratin als mögliches Autoantigen für IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Bei der Psoriasis hätte man erwartet, dass eine T-Zell-Aktivität gegenüber Keratin 17 sichtbar ist, da dieses als Autoantigen für vor allem CD8⁺ T-Zellen beschrieben wurde (Johnston et al., 2004).

Eine erste Begründung für die fehlende Aktivierung könnte darin liegen, dass die hier verwendeten Peptidsequenzen nicht mit den verwendeten von Johnston et al. übereinstimmten (Johnston et al., 2004). Dieses Problem sollte aber durch die Überlappung von 5 Aminosäuren der 15mer Sequenzen des Proteins vermieden werden. Hingegen verwendeten Yunusbaeva et al. Keratin 17 in voller Länge und sahen eine starke T-Zell-Proliferation, sodass dies ein Ansatzpunkt wäre, die Aktivierungsrate zu verbessern. Allerdings beschrieben sie nicht, ob es sich dabei um CD8⁺ T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen handelte (Yunusbaeva et al., 2018).

Lande et al. haben diese Erkenntnis, dass T-Zellen von Psoriasis Patienten auf Keratin 17 reagieren, auch bestätigt. Außerdem konnten bei ihnen auch Reaktionen auf Keratin 6 festgestellt werden (Lande et al., 2014). T-Zell-Klone, die auf Keratin 6 reagierten, konnte die Arbeitsgruppe um Berner et al. auch finden, deren untersuchtes Patientenkollektiv eventuell Psoriasis-ähnliche Läsionen durch Haut toxische Effekt bei Immuntherapien entwickelt hatten (Berner et al., 2019). Bei Besgen et al. reagierten die T-Zellen einiger Patienten

mit Psoriasis auf Keratin 6 bei in vitro Stimulation, jedoch nicht vermehrt im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppen (Besgen et al., 2010).

Keratin 6 konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit CD8+ T-Zellen von Patienten mit Psoriasis nicht aktivieren. Somit können die oben beschriebenen Entdeckungen nicht bestätigt werden.

Zudem wurde durch andere Arbeiten festgestellt, dass der Krankheitsstatus und der Genotyp HLA-C*06:02 einen Effekt auf die T-Zell-Proliferationsrate hat. Die Allel-Dosis dieses Risikolocus korreliert positiv mit der Stärke der T-Zell-Antwort (Yunusbaeva et al., 2018). Ob die Psoriasis Patienten bei diesen Versuchen den Risikolocus aufwiesen, wurde nicht getestet. Bei einer Studie von Gudjonsson et al. hatten ungefähr ein Drittel der Psoriasis Patienten diesen Risikolocus nicht aufgewiesen (Gudjonsson et al., 2003). Es kann beispielsweise sein, dass keiner der Patienten den Risikolocus hatte, und deshalb die CD8+ T-Zellen durch Keratin 17 in den Experimenten nicht aktiviert wurden. Die geringe Zahl der in dieser Arbeit eingeschlossenen Psoriasis-Patienten trägt zu dieser Vermutung bei. Die Krankheitsschwere kann auch eine Rolle in der Aktivierungsrate spielen. Da der PASI Score der Patienten der hier verwendeten Proben nicht erhoben wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Kohorte bezüglich des Krankheitsstatus vergleichbar mit der Kohorte von Yunusbaeva et al. war.

4.2 Aktivierung durch Peptidpools von Zelladhäsionsmolekülen

Nicht nur bei den Keratinen, sondern auch bei den Protein-spannenden Peptidpools des ADH-Superpools konnten Aktivierungen von CD8+ T-Zellen festgestellt werden.

Die CD8+ T-Zellen von drei Lichen ruber Patientenproben (10 %) zeigten eine Aktivierung durch mindestens einen entsprechenden Protein-spannenden

Peptidpool. Bei der Probe LR_09 konnte eine Reaktion auf die Peptid-Pools von BP180 und Dsg 3 festgestellt werden. Ebenfalls wurden die CD8+ T-Zellen der Lichen ruber Patientenprobe LR_24 durch die Protein-spannenden Peptidpools von BP180 und Dsg 3 aktiviert. Auf den Peptidpool von Dsg 3 reagierten auch IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen von LR_10, welche auch auf Dsg 1 eine Aktivität zeigten. Allerdings zeigte sich bei LR_10 auch eine Aktivierung durch die Negativkontrolle Aktin-Pool, weshalb die Reaktion von LR_10 auf Dsg 3 und Dsg 1 nicht gewertet werden kann.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Entdeckungen von Schmidt et al. Sie zeigten, dass BP180 und Dsg 3 neben ihrer Funktion als Autoantigene bei Pemphigus vulgaris und Bullösem Pemphigoid, auch als Zielantigene bei Lichen ruber fungieren (Schmidt et al., 2018). Bei ihnen waren es allerdings nicht die CD8+ T-Zellen, sondern CD4+ T-Helferzellen, die diese Reaktion zeigten. Ob bei ihnen auch CD8+ T-Zellen eine Reaktion auf BP180 und Dsg 3 gezeigt haben, wird nicht beschrieben (Schmidt et al., 2018). Es bleibt offen, ob die T-Helferzellen der hier verwendeten Patientenproben eine Aktivierung durch BP180 und Dsg 3 gezeigt hätten.

Interessant ist die Aktivierung der IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen auf genau diese Peptide dennoch, da Schmidt et al. einen anderen Versuchsansatz zur Messung der Aktivierung der T-Zellen verwendeten. Zur Analyse der Zytokinausschüttung (IFN γ , IL-17A, IL-5) verwendeten sie einen ELISpot Assay (Schmidt et al., 2018). Unter anderem nutzten sie zur Stimulation der T-Zellen Dsg 1 und 3 als ganze Peptide und BP180 aufgeteilt in nur 2 Aminosäuresequenzen, und nicht wie hier als Proteine in 15mer Fragmenten. Oben wurde beschrieben, dass die T-Zell-Proliferation bei den Psoriasis Patientenproben durch die Verwendung von Keratin 17 in voller Länge besser hätte funktionieren können. Diese Theorie kann an dieser Stelle wieder in Frage gestellt werden, da hier auch durch Fragmente von BP180 und Dsg 3 eine T-Zell-Antwort erzielt werden konnte. Dass es bei Schmidt et al. keine signifikante Reaktion auf Dsg 1 gab, stimmt mit den hier erzielten Ergebnissen überein (Schmidt et al., 2018). Zudem ist Desmoglein 1 eher unwahrscheinlich als Autoantigen in Frage gekommen, da es in den oberen

Zellschichten exprimiert wird und nicht basal, wo die infiltrierenden T-Zellen gefunden wurden (Lehman et al. 2009; Najor 2018).

BP180 und Dsg 3 können als bereits bekannte Autoantigene für CD4+ T-Zellen ergänzend auch als Autoantigene für IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen vermutet werden. Weitere Untersuchungen sind hier nötig.

Die Psoriasis Patientenprobe PS_03 zeigte bei dem Peptidpool von Dsc 3 eine relativ ausgeprägte Aktivität. Desmocollin 3 wurde in der Literatur nicht als Autoantigen für CD8+ T-Zellen beschrieben. Jedoch fanden Dolcino et al. Antikörper gegen ein Peptid mit Aminosäurehomologien zu Dsc 3 bei Patienten mit Psoriasis Arthritis (Dolcino et al., 2014). Patient PS_03 wies zum Zeitpunkt der Probengewinnung keine Psoriasis Arthritis auf. Interessant ist die Aktivierung, weil Berner et al. bei einem Patienten mit Immuntherapie und toxischen Nebenwirkungen an der Haut IFN- γ + CD8+ T-Zellen fanden, die in der Haut gegen Dsc 3 spezifisch waren (Berner et al., 2019). Diese toxischen Nebenwirkungen können auch Psoriasis-ähnlich sein (Geisler et al., 2020). Dsc 3 könnte als Autoantigen der IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen bei Psoriasis eine Rolle spielen. Zur Bestätigung sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.3 Fehlende Aktivierung durch Peptidpools von Psoriasis-Antigenen

Auf die bekannten Psoriasis-Antigene ADAMTSL 5 und LL-37 konnte weder bei Psoriasis Proben noch bei Lichen ruber Proben eine Reaktion festgestellt werden. Bei den Lichen ruber Proben war die fehlende Reaktion zu erwarten, jedoch nicht bei den Psoriasis Patientenproben.

Arakawa et al. identifizierten das melanozytäre ADAMTSL5 als Autoantigen bei Psoriasis. Bei ihnen haben bei der T-Zell-Stimulation mit ADAMTSL5 61,9 % der Proben durch Ausschüttung von IL-17A und/oder IFN- γ reagiert. (Arakawa et al.,

2015). Bei dieser hohen Prozentzahl wäre zu erwarten gewesen, dass die IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺ CD8⁺ T-Zellen von mindestens drei der hier verwendeten Patientenproben eine Aktivierung gezeigt hätten. Das IL-17A wurde bei den durchgeführten T-Zell-Stimulationen nicht gemessen. Eventuell hätte diese Messung eine Aktivierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die IL-17A ausschütten, durch ADAMTSL5 aufgezeigt. Zufälligerweise könnten die hier verwendeten Patientenproben lediglich IL-17A exprimierende spezifische CD8⁺ T-Zellen gehabt haben, wodurch eine Aktivierung dieser auf ADAMTSL5 nicht gemessen werden konnte. Allerdings war auch keine Aktivierung von IFN γ ⁺ TNF α ⁻ CD8⁺ T-Zellen in den hier durchgeführten Experimenten sichtbar, welches bei Arakawa et al. der Fall war (Arakawa et al., 2015).

Eine HLA-C*06:02 Restriktion konnten Arakawa et al. bei Stimulation von PBMCs nicht feststellen, da die PBMCs von sowohl HLA-C*06:02-positiven, als auch HLA-C*06:02-negativen Patienten, gleich auf die Peptidstimulation reagierten (Arakawa et al., 2015). Daher ist es unwahrscheinlich, dass die HLA-Restriktion in diesem Fall die Begründung für die fehlende Reaktion darstellt. Möglicherweise hatten die hier verwendeten fragmentierten Peptide auch einen Einfluss auf die fehlende Reaktion, da Arakawa et al. ADAMTSL5 in voller Länge verwendeten (Arakawa et al., 2015).

Lande et al. haben das antimikrobielle Peptid LL-37 als T-Zell-Autoantigen bei Psoriasis identifiziert. Bei ihnen proliferierten bei über 83 % der Patienten CD4⁺ T-Zellen, aber auch bei knapp 47 % der Patienten CD8⁺ T-Zellen (Lande et al., 2014).

Oben wurde beschrieben, dass eine IL-17-Messung eine Aktivierung von IL-17⁺ IFN γ ⁻ CD8⁺ T-Zellen möglicherweise aufgedeckt hätte. Lande et al. konnten bei den CD8⁺ T-Zellen, die eine Reaktion auf LL-37 zeigten, lediglich eine signifikante Menge von IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen erkennen. IL-17 schütteten bei ihnen nur wenig CD8⁺ T-Zellen, sondern vor allem CD4⁺ T-Zellen aus (Lande et al., 2014). Die fehlende Messung von IL-17 ist bezüglich der auf LL-37 reagierenden CD8⁺ T-Zellen vernachlässigbar. Jedoch konnte in den hier

durchgeführten Versuchen auch keine Aktivierung von IFN- γ + CD8+ T-Zellen durch LL-37 beobachtet werden.

75 % der Patienten, deren Proben bei ihnen reagierten, hatten eine moderate bis schwere Psoriasis-Erkrankung, welche mittels PASI Score angegeben wurde (Lande et al., 2014). Der PASI Score der Patienten der hier verwendeten Proben wurde nicht routinemäßig in der Diagnostik erhoben. Somit kann nicht gesagt werden, ob aufgrund der Schwere der Erkrankung der Patienten der hier verwendeten Proben eine Reaktion erwartbar gewesen wäre, oder nicht.

Eine mögliche Begründung in der fehlenden Aktivierung der IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen könnte in der unterschiedlichen Länge der Aminosäurefragmente der verwendeten Peptide liegen. Lande et al. sahen eine Proliferation von CD8+ T-Zellen als Reaktion auf Peptidfragmente von LL-37 mit neun bis zehn Aminosäuren. Jedoch konnten sie auch eine Reaktion auf LL-37 aufgeteilt in ein C-terminales und N-terminales Peptid erkennen (Lande et al., 2014). Demnach ist es fraglich, ob die hier verwendeten 15mer Fragmente mit fünf Aminosäuren Überlappung von LL-37 eine große Rolle gespielt haben.

Wie bei ADAMTSL5 hat die HLA-Restriktion bei LL-37 vermutlich keine Rolle gespielt. Lande et al. beschreiben, dass nicht nur HLA-Cw*06:02, sondern auch viele andere HLA-Typen LL-37 präsentieren (Lande et al., 2014).

Grundsätzlich konnten Lande et al. weniger CD8+ T-Zellen als CD4+ T-Zellen im Blut detektieren. Sie stellten die Theorie auf, dass CD8+ T-Zellen im Blut von Psoriasis Patienten Effektorzellen mit geringer Proliferationskapazität sind und deshalb bei den in vitro Stimulationen wenig Reaktion in Form von Proliferation aufwiesen (Lande et al., 2014). Das würde mit den hier fehlenden Reaktionen von IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen übereinstimmen.

Die beiden in der Literatur beschriebenen Antigene ADAMTSL5 und LL-37 konnten für IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Psoriasis in den hier durchgeführten Stimulationen nicht bestätigt werden.

4.4 Geringe Aktivierungsrate

Insgesamt stellt sich die Frage, weshalb 17 Proben auf die Superpools reagiert haben und davon nur sieben auf mindestens einen darin enthaltenen Protein-spannenden Peptidpool. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es in den Superpools durch mehr verschiedene Peptide auch ein höheres Reaktionspotential gibt, welches dann eine synergistische Aktivierung der IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen bewirkt. Das sieht man beispielsweise auch daran, dass der prozentuale Anteil IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen auf den Keratin-Superpool überwiegend geringer bei den Protein-spannenden Peptidpools ausfällt, im Vergleich zu den Reaktionen bei den Superpools. Dieses Phänomen kann allerdings bei dem ADH-Superpool und dessen Protein-spannenden Peptidpools nicht beobachtet werden. Hier sind die prozentualen Anteile an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen höher als beim Superpool. Es stellt sich die Frage, ob man diese prozentualen Anteile direkt miteinander vergleichen kann, da die Stimulationen an verschiedenen Tagen stattfanden und möglicherweise unbeabsichtigt unterschiedliche Bedingungen herrschten, wie beispielsweise die Funktionsfähigkeit des zugegebenen IL-2 oder der Zusammensetzung des IVS-Mediums.

Es ist auch möglich, dass die Zellen durch andere Faktoren, wie Interleukine, Zytokine oder andere Antigene in den Superpools aktiviert wurden, welche bei der Stimulation mit den Protein-spannenden Peptidpools nicht vorhanden waren. Stimulierende Interleukine und Zytokine wären am wahrscheinlichsten in den Blutproben der Patienten von Beginn an vorhanden gewesen. Somit müssten die Zytokine und Interleukine nicht nur bei den Superpools, sondern auch in Wells der Protein-spannenden Peptidpools enthalten gewesen sein, da die verwendeten PBMCs eines Patienten zum selben Zeitpunkt abgenommen, aus dem Patientenblut extrahiert, und eingefroren wurden.

Es könnten auch äußere Umstände, wie unbeabsichtigt unterschiedliche Versuchsbedingungen, dazu beigetragen haben, dass die Reaktionen verschieden ausgefallen sind. Beispielsweise könnten unterschiedlich viele

T-Zellen in einem Well zu Beginn einer Stimulation vorhanden gewesen sein, wodurch die Menge an proliferierenden IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen beeinflusst wäre. Letztendlich sind auch Fehler bei der Peptid-Pool Zugabe oder Beschriftung denkbar.

4.5 Limitationen und Verbesserungspotential

Die Versuche wurden in erster Linie durch die Verfügbarkeit von Patientenproben limitiert. Zur Validierung der Ergebnisse wären Bestätigungsversuche sinnvoll, welche durch die begrenzte Verfügbarkeit von Patientenproben nicht durchgeführt werden konnten.

Bei der Probenakquirierung konnten nur sechs Proben von Patienten mit Psoriasis gesammelt werden. Die Gewinnung der Proben war unter anderem limitiert, weil die Patienten in den letzten 6 Monaten keine Systemtherapie erhalten haben sollten. Eine größere Kohorte wäre sinnvoll gewesen. Lande et al. verwendeten bei ihren Versuchen 52, Arakawa et al. 47 und Johnston et al. 23 Psoriasis Patientenproben (Arakawa et al., 2015; Johnston et al., 2004; Lande et al., 2014). Bei einer größeren Anzahl an Proben wäre eher eine Reaktion durch die T-Zell Stimulation bei einzelnen Patienten zu erwarten gewesen. Beispielsweise weil mit größerer Wahrscheinlichkeit Proben von Patienten mit dem Geno-Typ HLA-C*06:02, welcher bei vielen Psoriasis Patienten gefunden wird, in der Kohorte wären (Gudjonsson et al., 2003). Die Kohortengröße von 29 Lichen ruber Patientenproben ist eher unwahrscheinlich die Begründung, weshalb auf die beschriebenen Antigene bei Lichen ruber nur wenige Reaktionen festgestellt werden konnten.

Um bei den Psoriasis Patienten eine Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen herzustellen, sollte in Zukunft der PASI Score der Patienten ermittelt werden (Lande et al., 2014).

Eine Steigerung der Aktivierungsrate könnte eventuell auch durch Verwendung anderer Peptidsequenzen bei der in vitro Stimulation der PBMCs erreicht werden. Mit Keratin 17 und ADAMTSL5 in voller Länge wurden gute Reaktionen von T-Zellen bei Patienten mit Psoriasis erzielt (Arakawa et al., 2015; Johnston et al., 2004).

Neben den CD8+ T-Zellen sind auch CD4+ T-Zellen zentral in der Pathogenese der Psoriasis beteiligt (Lande et al., 2014). BP180 und Dsg 3 wurden als Antigen für T-Helferzellen bei Patienten mit Lichen ruber beschrieben. Außerdem wurden CD4+ T-Zellen in den Läsionen gefunden (Schinner et al., 2023; Schmidt et al., 2018). Daher wäre es in weiteren Untersuchungen sinnvoll, nicht nur CD8+ T-Zellen, sondern auch CD4+ T-Zellen in die Auswertungen und weiteren Stimulationen mit ein zu beziehen.

Ein weiterer Ansatz wäre, weitere Zytokine als Aktivierungsmarker in die Analyse aufzunehmen. Ein Beispiel hierfür ist IL-17A. IL17A+ CD8+ T-Zellen konnten von Arakawa et al. nach T-Zell-Stimulation mit ADAMTSL5 von PBMCs von Psoriasis Patienten gemessen werden (Arakawa et al., 2015). Reaktive T-Helferzellen auf BP180 und Dsg 3 bei Schmidt et al. schütteten ebenfalls IL-17A aus (Schmidt et al., 2018). Zudem fanden Schinner et al. IL-17A+ CD4+ T-Zellen in Hautläsionen von Patienten mit Lichen ruber (Schinner et al., 2023). Des Weiteren könnte die Messung der Ausschüttung von IL-22 in weiteren Experimenten in Erwägung gezogen werden (Arakawa et al., 2015; Hijnen et al., 2013; Lande et al., 2014).

Möglicherweise hängt die hier festgestellte geringe Aktivierungsrate mit einer ungenauen Detektion der reaktiven T-Zellen zusammen. Eine sensitivere Methode, um T-Zellen, die einen spezifischen T-Zell-Rezeptor für ein bestimmtes Peptid aufweisen, mit dem Durchflusszytometer zu messen, stellt die Färbung mit Tetrameren dar (Lande et al., 2014). Zur Messung der Zytokinsekretion könnte man in Zukunft auch einen ELISpot Assay in Erwägung ziehen, wie es Schmidt, et al. durchgeführt haben (Schmidt et al., 2018).

4.6 Ausblick

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten in vitro Stimulationen kann Keratin 14 als Autoantigen von CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Lichen ruber vermutet werden. Desmoglein 3 und BP180 stellen ebenfalls vielversprechende Autoantigene für CD8+ T-Zellen bei Lichen ruber dar. Keratin 10 könnte in weiteren Untersuchungen als mögliches Autoantigen für CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Lichen ruber und Desmocollin 3 bei Patienten mit Psoriasis verfolgt werden.

Es bleibt in den hier durchgeführten Versuchen unklar, ob es sich bei den gemessenen Reaktionen um für die jeweiligen Erkrankungen spezifische T-Zell Reaktionen handelt oder um krankheitsunspezifische Reaktionen. Um zu belegen, dass es sich bei den gemessenen Reaktionen um Psoriasis- und Lichen ruber-spezifische Reaktionen handelt, sollten die T-Zell Stimulationen mit PBMCs einer vergleichbaren, gesunden, gleichaltrigen Kontrollgruppe durchgeführt werden (Arakawa et al., 2015; Lande et al., 2014). Wenn sich hier zeigt, dass sich keine oder weniger autoreaktive T-Zellen in den PBMCs der gesunden Kontrollgruppe finden lassen, kann davon ausgegangen werden, dass die autoreaktiven T-Zellen eine Rolle in den Erkrankungen spielen.

Zudem ist unbekannt, welche genaue Peptidsequenz von Keratin 14, Dsg 3, BP180 (, Keratin 10 und Keratin 5) die Aktivierung der CD8+ T-Zellen hervorgerufen hat. In den durchgeführten T-Zell-Stimulationen wurden fragmentierte Proteine in den Protein-spannenden Peptidpools verwendet. Um die genaue Aminosäuresequenz zu ermitteln, sollte zuerst der HLA-Typ der Patienten bestimmt werden, deren CD8+ T-Zellen bei den Stimulationen reagiert haben. Dies kann durch HLA-Sequenzierung der entsprechenden PBMCs erfolgen. Vom HLA-Typ hängt ab, welche Sequenz der Proteine auf dem MHC-Molekül der antigenpräsentierenden Zellen präsentiert wird und dementsprechend durch die CD8+ T-Zellen erkannt wird. Die Ergebnisse der HLA-Sequenzierung können Aufschluss darüber geben, ob ein HLA-Typ bei den Patienten, deren CD8+ T-Zellen bei der Stimulation reagiert haben, z.B. gehäuft vorhanden ist oder ob es sich um den gleichen HLA-Typ handelt. Ist der HLA-

Typ bekannt, könnte z.B. mittels Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) eine Vorhersage getroffen werden, welche Peptide des Proteins bei welchem HLA-Typ am wahrscheinlichsten auf dem MHC I-Molekül präsentiert werden. Die Peptide mit der höchsten Immunogenität können daraufhin synthetisiert werden und für weitere Stimulationen von PBMCs des passenden HLA-Typs verwendet werden. Ist hierbei eine Reaktion der T-Zellen sichtbar, kann darauf geschlossen werden, dass der T-Zell-Rezeptor gegen genau dieses Peptid gerichtet ist und die T-Zellen dadurch aktiviert wurden.

In einem nächsten Schritt könnte ermittelt werden, ob die gleichen Peptide auch auf den MHC-Molekülen in den betroffenen Hautläsionen der Erkrankten präsentiert werden. Nur so kann darauf geschlossen werden, dass die darauf reagierenden T-Zellen im Gewebe agieren. Von den Patienten, deren PBMCs hier verwendet wurden, wurden bei deren Einverständnis Gewebeproben aus Hautläsionen entnommen und eingefroren. Aus den eingefrorenen Gewebeproben könnten die MHC I-Moleküle isoliert und die darauf gebundenen Liganden mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Dieses Ergebnis kann dann mit den vorhergesagten Peptiden aus der IEDB-Analyse und den T-Zell-Stimulationen verglichen werden.

Zudem wäre es auch interessant zu wissen, ob im Blut und in den Hautläsionen die gleichen T-Zellen und deren T-Zell-Rezeptoren nachgewiesen werden können. Nicht nur die Peptide der auf den in Hautläsionen vorhandenen MHC I-Molekülen können in Gewebeproben von Erkrankten analysiert werden. Aus diesen Gewebeproben könnte auch DNA extrahiert werden, aus der anschließend eine T-Zell-Rezeptor-Sequenzierung möglich ist. Gleichzeitig wird mit den PBMCs, die von den gleichen Patienten stammen wie das analysierte Gewebe, eine T-Zell Stimulation durchgeführt und aktivierte CD8⁺ T-Zellen sortiert. Aus diesen reaktiven CD8⁺ T-Zellen kann ebenfalls die DNA extrahiert werden. Diese kann dann dafür genutzt werden, die DNA-Sequenzen der T-Zell-Rezeptoren der T-Zellen im Gewebe und Blut zu vergleichen. Stimmen diese DNA-Sequenzen von T-Zell-Rezeptoren aus Läsionen und Blut überein, kann

darauf geschlossen werden, dass die T-Zellen aus dem Blut in das Gewebe einwandern und dort agieren.

Möchte man darüber hinaus die genaue Lokalisation der reaktiven T-Zellen in den Läsionen bestimmen, könnte man den Spatial Transcriptomics Ansatz verfolgen (Hudson & Sudmeier, 2022).

Hat man spezifische T-Zellen gefunden, könnte man testen, ob die reaktiven T-Zellen eine Wirkung auf die in den Hautläsionen befindlichen Peptid-präsentierenden Zielzellen haben. Hierzu würde man PBMCs mit den entsprechenden Peptiden stimulieren und die Keratinozyten mit den gleichen Peptiden beladen, sodass diese die Peptide auf ihren MHC-Molekülen präsentieren. Anschließend werden die PBMCs und die Keratinozyten gemeinsam kultiviert. Danach kann untersucht werden, ob sich beispielsweise die Peptid-präsentierenden Keratinozyten in ihrer Morphologie verändern oder in Apoptose gehen, um die Auswirkung der zytotoxischen T-Zellen zu erforschen. Beispielsweise, ob CD8⁺ T-Zellen tatsächlich für den Untergang von Keratin 14-exprimierenden basalen Keratinozyten verantwortlich sind (Wei et al., 2016).

Außerdem könnte die Gewinnung der T-Zellen nicht nur aus Blut erfolgen, sondern auch aus betroffenen Hautpartien. Die Aktivierung von aus betroffener Haut isolierten CD8⁺ T-Zellen scheint besser zu sein, als die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen bei Gewinnung aus peripherem Blut (Lande et al., 2014). Zudem konnten viele T-Zellen in Psoriasis Hautproben gefunden werden (Kryczek et al., 2008). Dieser Ansatz ist eventuell zielführender, da man so direkt die in der Haut beteiligten T-Zellen isolieren kann. Hier wäre zudem ein Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen aus Blut möglich.

4.7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnten potentielle Autoantigene von CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis ermittelt werden. Vor allem das Keratin 14 kann nun als Autoantigen für CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Lichen ruber vermutet werden. Neben dem Keratin 14 sind auch Desmoglein 3 und BP180 in den Fokus als mögliche Autoantigene von CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Lichen ruber gerückt. Auch Keratin 10 konnte eine Aktivierung von CD8+ T-Zellen bei einem Lichen ruber Patienten, und Desmocollin 3 bei einem Psoriasis Patienten bewirken.

Mit den hier erzielten Ergebnissen ist eine Grundlage für weitere Experimente zur Ermittlung von Autoantigenen für CD8+ T-Zellen vor allem bei Patienten mit Lichen ruber hergestellt. In erster Linie kann das Keratin 14 als mögliches Autoantigen bei Lichen ruber Patienten in zukünftigen Experimenten näher betrachtet werden. Auch Desmoglein 3 und BP180 sollten weiter verfolgt werden.

Es sind weitere Experimente notwendig, um diese potentiellen Autoantigene sicher als Autoantigene für CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Lichen ruber zu definieren.

5 Zusammenfassung

Bei den inflammatorischen Dermatosen Lichen ruber und Psoriasis spielen T-Zellen in der Pathogenese eine entscheidende Rolle. Vor allem die CD8+ T-Zellen sind von besonderem Interesse. Weitestgehend unbekannt sind hingegen die Antigene, gegen welche die CD8+ T-Zellen gerichtet sind. Bisher beschriebene Autoantigene sind bei Patienten mit Lichen ruber die Zelladhäsionsmoleküle Desmoglein 3 und BP180 für CD4+ T-Zellen (Schmidt et al., 2018). Als Autoantigene für CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Psoriasis wurden ADAMTSL5, LL-37 und Keratin 17 identifiziert (Arakawa et al., 2015; Johnston et al., 2004; Lande et al., 2014).

In dieser Arbeit wurden in vitro Stimulationen humaner PBMCs von Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis mit den bereits beschriebenen und anderen in Frage kommenden Autoantigenen durchgeführt. Es wurden verschiedene Keratine (Keratin 1, 2, 5, 6A-C, 10, 14, 16) und zwei weitere Zelladhäsionsmoleküle (Dsg 1, Dsc 3) ergänzt. Nach der Stimulation wurde die Aktivierung von CD8+ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Die Gewinnung der Patientenproben erfolgte in der Universitätsklinik Tübingen. In die Experimente wurden 29 Proben von Patienten mit Lichen ruber und sechs Proben von Patienten mit Psoriasis eingeschlossen.

Durch Keratin 14 zeigten 10 % der Proben von Patienten mit Lichen ruber eine Aktivierung, wodurch es als Autoantigen für CD8+ T-Zellen in den Fokus gerückt ist. Auf Desmoglein 3 und BP180 zeigten 7 % der Patienten mit Lichen ruber eine Reaktion der CD8+ T-Zellen. Bei einem Patienten mit Psoriasis zeigte sich eine Aktivierung durch Desmocollin 3. Auf die anderen verwendeten Peptide konnten keine Reaktionen festgestellt werden.

Mit diesen Ergebnissen wurde eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Bestimmung von Autoantigenen von CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Lichen ruber und Psoriasis geschaffen. Zur genauen Identifizierung spezifischer Autoantigene für CD8+ T-Zellen beider Erkrankungen müssen weitere Nachforschungen stattfinden.

6 Literaturverzeichnis

- Aghamajidi, A., Raoufi, E., Parsamanesh, G., Jalili, A., Salehi-Shadkami, M., Mehrali, M. et al. (2021). The attentive focus on T cell-mediated autoimmune pathogenesis of psoriasis, lichen planus and vitiligo. *Scandinavian Journal of Immunology*, 93 (4), e13000. doi:10.1111/sji.13000
- Aldehlawi, H., Usman, S., Lalli, A., Ahmad, F., Williams, G., Teh, M.-T. et al. (2020). Serum lipids, retinoic acid and phenol red differentially regulate expression of keratins K1, K10 and K2 in cultured keratinocytes. *Scientific Reports*, 10 (1), 4829. doi:10.1038/s41598-020-61640-9
- Arakawa, A., Siewert, K., Stöhr, J., Besgen, P., Kim, S.-M., Rühl, G. et al. (2015). Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *Journal of Experimental Medicine*, 212 (13), 2203–2212. doi:10.1084/jem.20151093
- Arda, O., Göksügür, N. & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, 32 (1), 3–13. doi:10.1016/j.clin-dermatol.2013.05.021
- Austin, L. M., Ozawa, M., Kikuchi, T., Walters, I. B. & Krueger, J. G. (1999). The Majority of Epidermal T Cells in Psoriasis Vulgaris Lesions can Produce Type 1 Cytokines, Interferon- γ , Interleukin-2, and Tumor Necrosis Factor- α , Defining TC1 (Cytotoxic T Lymphocyte) and TH1 Effector Populations:1 a Type 1 Differentiation Bias is also Measured in Circulating Blood T Cells in Psoriatic Patients. *Journal of Investigative Dermatology*, 113 (5), 752–759. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00749.x
- Bader, H. L., Wang, L. W., Ho, J. C., Tran, T., Holden, P., Fitzgerald, J. et al. (2012). A disintegrin-like and metalloprotease domain containing thrombospondin type 1 motif-like 5 (ADAMTSL5) is a novel fibrillin-1-, fibrillin-2-, and heparin-binding member of the ADAMTS superfamily containing a netrin-like module. *Matrix Biology*, 31 (7–8), 398–411. doi:10.1016/j.mat-bio.2012.09.003
- Berner, F., Bomze, D., Diem, S., Ali, O. H., Fässler, M., Ring, S. et al. (2019). Association of Checkpoint Inhibitor–Induced Toxic Effects With Shared Cancer and Tissue Antigens in Non–Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncology*, 5 (7), 1043. doi:10.1001/jamaoncol.2019.0402
- Besgen, P., Trommler, P., Vollmer, S. & Prinz, J. C. (2010). Ezrin, Maspin, Peroxiredoxin 2, and Heat Shock Protein 27: Potential Targets of a Streptococcal-Induced Autoimmune Response in Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 184 (9), 5392–5402. doi:10.4049/jimmunol.0903520
- Bieber, K., Sun, S., Ishii, N., Kasperkiewicz, M., Schmidt, E., Hirose, M. et al. (2010). Animal models for autoimmune bullous dermatoses: Animal models for autoimmune skin blistering diseases. *Experimental Dermatology*, 19 (1), 2–11. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00948.x
- Bloor, B. K., Tidman, N., Leigh, I. M., Odell, E., Dogan, B., Wollina, U. et al. (2003). Expression of Keratin K2e in Cutaneous and Oral Lesions. *The American Journal of Pathology*, 162 (3), 963–975. doi:10.1016/S0002-9440(10)63891-6

- Boch, K., Langan, E. A., Kridin, K., Zillikens, D., Ludwig, R. J. & Bieber, K. (2021). Lichen Planus. *Frontiers in Medicine*, 8, 737813. doi:10.3389/fmed.2021.737813
- Bonifacio, K. M., Kunjraiva, N., Krueger, J. G. & Duculan, J. F. (2016). Cutaneous Expression of A Disintegrin-like and Metalloprotease domain containing Thrombospondin Type 1 motif-like 5 (ADAMTSL5) in Psoriasis goes beyond Melanocytes. *Journal of Pigmentary Disorders*, 3 (3). doi:10.4172/2376-0427.1000244
- Byrne, C., Tainsky, M. & Fuchs, E. (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development*, 120 (9), 2369–2383. doi:10.1242/dev.120.9.2369
- Candi, E., Oddi, S., Paradisi, A., Terrinoni, A., Ranalli, M., Teofoli, P. et al. (2002). Expression of Transglutaminase 5 in Normal and Pathologic Human Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 119 (3), 670–677. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.01853.x
- Chetty, R. & Gatter, K. (1994). CD3: Structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *The Journal of Pathology*, 173 (4), 303–307. doi:10.1002/path.1711730404
- Dolcino, M., Lunardi, C., Ottria, A., Tinazzi, E., Patuzzo, G. & Puccetti, A. (2014). Crossreactive Autoantibodies Directed against Cutaneous and Joint Antigens Are Present in Psoriatic Arthritis. (P. Szodoray, Hrsg.) *PLoS ONE*, 9 (12), e115424. doi:10.1371/journal.pone.0115424
- Dominguez, R. & Holmes, K. C. (2011). Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*, 40 (1), 169–186. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359
- Dong, C. (2021). Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annual Review of Immunology*, 39 (1), 51–76. doi:10.1146/annurev-immunol-061020-053702
- Dorschner, R. A., Pestonjamas, V. K., Tamakuwala, S., Ohtake, T., Rudisill, J., Nizet, V. et al. (2001). Cutaneous Injury Induces the Release of Cathelicidin Anti-Microbial Peptides Active Against Group A Streptococcus. *Journal of Investigative Dermatology*, 117 (1), 91–97. doi:10.1046/j.1523-1747.2001.01340.x
- Enouz, S., Carrié, L., Merkler, D., Bevan, M. J. & Zehn, D. (2012). Autoreactive T cells bypass negative selection and respond to self-antigen stimulation during infection. *Journal of Experimental Medicine*, 209 (10), 1769–1779. doi:10.1084/jem.20120905
- Früh, K. & Yang, Y. (1999). Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon γ . *Current Opinion in Immunology*, 11 (1), 76–81. doi:10.1016/S0952-7915(99)80014-4
- Geisler, A. N., Phillips, G. S., Barrios, D. M., Wu, J., Leung, D. Y. M., Moy, A. P. et al. (2020). Immune checkpoint inhibitor-related dermatologic adverse events. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 83 (5), 1255–1268. doi:10.1016/j.jaad.2020.03.132
- Grievink, H. W., Luisman, T., Kluft, C., Moerland, M. & Malone, K. E. (2016). Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood

- Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, 14 (5), 410–415. doi:10.1089/bio.2015.0104
- Griffiths, C. E. M., Armstrong, A. W., Gudjonsson, J. E. & Barker, J. N. W. N. (2021). Psoriasis. *The Lancet*, 397 (10281), 1301–1315. doi:10.1016/S0140-6736(20)32549-6
- Gudjonsson, J. E., Karason, A., Antonsdottir, A., Runarsdottir, E. H., Hauksson, V. B., Upmanyu, R. et al. (2003). Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *British Journal of Dermatology*, 148 (2), 233–235. doi:10.1046/j.1365-2133.2003.05115.x
- Hecker, M., Qiu, D., Marquardt, K., Bein, G. & Hackstein, H. (2004). Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sanguinis*, 86 (1), 41–44. doi:10.1111/j.0042-9007.2004.00388.x
- Hewitt, E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, 110 (2), 163–169. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x
- Hijnen, D., Knol, E. F., Gent, Y. Y., Giovannone, B., Beijin, S. J. P., Kupper, T. S. et al. (2013). CD8+ T Cells in the Lesional Skin of Atopic Dermatitis and Psoriasis Patients Are an Important Source of IFN- γ , IL-13, IL-17, and IL-22. *Journal of Investigative Dermatology*, 133 (4), 973–979. doi:10.1038/jid.2012.456
- Hudson, W. H. & Sudmeier, L. J. (2022). Localization of T cell clonotypes using the Visium spatial transcriptomics platform. *STAR Protocols*, 3 (2), 101391. doi:10.1016/j.xpro.2022.101391
- Huter, E. N., Natarajan, K., Torgerson, T. R., Glass, D. D. & Shevach, E. M. (2010). Autoantibodies in Scurfy Mice and IPEX Patients Recognize Keratin 14. *Journal of Investigative Dermatology*, 130 (5), 1391–1399. doi:10.1038/jid.2010.16
- Ioannides, D., Vakirlis, E., Kemeny, L., Marinovic, B., Massone, C., Murphy, R. et al. (2020). European S1 guidelines on the management of lichen planus: a cooperation of the European Dermatology Forum with the European Academy of Dermatology and Venereology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34 (7), 1403–1414. doi:10.1111/jdv.16464
- Irvine, C., Irvine, F. & Champion, R. H. (1991). Long-term follow-up of lichen planus. *Acta Dermato-Venereologica*, 71 (3), 242–244.
- Jang, D., Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B. et al. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (5), 2719. doi:10.3390/ijms22052719
- Javanian, M., Barary, M., Ghebrehewet, S., Koppolu, V., Vasigala, V. & Ebrahimipour, S. (2021). A brief review of influenza virus infection. *Journal of Medical Virology*, 93 (8), 4638–4646. doi:10.1002/jmv.26990

- Jin, L. & Wang, G. (2014). Keratin 17: A Critical Player in the Pathogenesis of Psoriasis: KERATIN 17. *Medicinal Research Reviews*, 34 (2), 438–454. doi:10.1002/med.21291
- Johnston, A., Gudjonsson, J. E., Sigmundsdottir, H., Love, T. J. & Valdimarsson, H. (2004). Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8+ T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 138 (1), 83–93. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.00600.x
- Jones, J. C. R. & Green, K. J. (1991). Intermediate filament plasma membrane interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, 3 (1), 127–132. doi:10.1016/0955-0674(91)90175-X
- Karrer, U. & Nadal, D. (2014). Epstein-Barr-Virus und infektiöse Mononukleose. EMH Swiss Medical Publishers. doi:10.5167/UZH-96029
- Ko, H.-C., Jwa, S.-W., Song, M., Kim, M.-B. & Kwon, K.-S. (2010). Clinical course of guttate psoriasis: Long-term follow-up study: Clinical course of guttate psoriasis. *The Journal of Dermatology*, 37 (10), 894–899. doi:10.1111/j.1346-8138.2010.00871.x
- Kryczek, I., Bruce, A. T., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Aphale, A., Vatan, L. et al. (2008). Induction of IL-17+ T Cell Trafficking and Development by IFN- γ : Mechanism and Pathological Relevance in Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 181 (7), 4733–4741. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4733
- Lande, R., Botti, E., Jandus, C., Dojcinovic, D., Fanelli, G., Conrad, C. et al. (2014). The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nature Communications*, 5 (1), 5621. doi:10.1038/ncomms6621
- Le Cleach, L. & Chosidow, O. (2012). Lichen Planus. *New England Journal of Medicine*, 366 (8), 723–732. doi:10.1056/NEJMcp1103641
- Lehman, J. S., Tollefson, M. M. & Gibson, L. E. (2009). Lichen planus. *International Journal of Dermatology*, 48 (7), 682–694. doi:10.1111/j.1365-4632.2009.04062.x
- Love, T. J., Gudjonsson, J. E., Valdimarsson, H. & Gudbjornsson, B. (2012). Psoriatic Arthritis and Onycholysis — Results from the Cross-sectional Reykjavik Psoriatic Arthritis Study. *The Journal of Rheumatology*, 39 (7), 1441–1444. doi:10.3899/jrheum.111298
- Lowe, N. J., Cudworth, A. G. & Woodrow, J. C. (1976). HL-A antigens in lichen planus. *British Journal of Dermatology*, 95 (2), 169–171. doi:10.1111/j.1365-2133.1976.tb00821.x
- Lu, R., Zeng, X., Han, Q., Lin, M., Long, L., Dan, H. et al. (2014). Overexpression and Selectively Regulatory Roles of IL-23/IL-17 Axis in the Lesions of Oral Lichen Planus. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–12. doi:10.1155/2014/701094
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120 (1). doi:10.1002/cpim.40
- McMillan, J. R., Akiyama, M. & Shimizu, H. (2003). Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *Journal of Dermatological Science*, 31 (3), 169–177. doi:10.1016/S0923-1811(03)00045-8

- Michalek, I. M., Loring, B. & John, S. M. (2017). A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31 (2), 205–212. doi:10.1111/jdv.13854
- Mittrücker, H.-W., Visekruna, A. & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62 (6), 449–458. doi:10.1007/s00005-014-0293-y
- Mommers, J. M., van Rossum, M. M., van Erp, P. E. J. & van de Kerkhof, P. C. M. (2000). Changes in Keratin 6 and Keratin 10 (Co-)Expression in Lesional and Symptomless Skin of Spreading Psoriasis. *Dermatology*, 201 (1), 15–20. doi:10.1159/000018422
- Nair, R. P., Stuart, P. E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N. V. C., Jenisch, S. et al. (2006). Sequence and Haplotype Analysis Supports HLA-C as the Psoriasis Susceptibility 1 Gene. *The American Journal of Human Genetics*, 78 (5), 827–851. doi:10.1086/503821
- Najor, N. A. (2018). Desmosomes in Human Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13 (1), 51–70. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-044030
- Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O. et al. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *Journal of Experimental Medicine*, 202 (1), 135–143. doi:10.1084/jem.20050500
- Nikaein, A., Phillips, C., Gilbert, S. C., Savino, D., Silverman, A., Stone, M. J. et al. (1991). Characterization of Skin-Infiltrating Lymphocytes in Patients with Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 96 (1), 3–9. doi:10.1111/1523-1747.ep12514646
- Pamer, E. & Cresswell, P. (1998). MECHANISMS OF MHC CLASS I-RESTRICTED ANTIGEN PROCESSING. *Annual Review of Immunology*, 16 (1), 323–358. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.323
- Peter, A. & Stick, R. (2015). Evolutionary aspects in intermediate filament proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 48–55. doi:10.1016/j.ceb.2014.12.009
- Peters, B., Nielsen, M. & Sette, A. (2020). T Cell Epitope Predictions. *Annual Review of Immunology*, 38 (1), 123–145. doi:10.1146/annurev-immunol-082119-124838
- Popovska, M., Atanasovska-Stojanovska, A., Todoroska, S., Radojkova-Nikolovska, V., Bedhxteti, L. Z., Spasovska-Gjorgovska, A. et al. (2020). Oral Lichen Planus – Related Connection with HLA-System Antigens. *PRILOZI*, 41 (1), 65–77. doi:10.2478/prilozi-2020-0024
- Ramalingam, S., Malathi, N., Thamizhchelvan, H., Sangeetha, N. & Rajan, S. T. (2018). Role of Mast Cells in Oral Lichen Planus and Oral Lichenoid Reactions. *Autoimmune Diseases*, 2018, 1–5. doi:10.1155/2018/7936564
- Reich, K., Papp, K. A., Matheson, R. T., Tu, J. H., Bissonnette, R., Bourcier, M. et al. (2015). Evidence that a neutrophil–keratinocyte crosstalk is an early target of IL -17A inhibition in psoriasis. *Experimental Dermatology*, 24 (7), 529–535. doi:10.1111/exd.12710

- Rheinländer, A., Schraven, B. & Bommhardt, U. (2018). CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters*, 196, 22–32. doi:10.1016/j.imlet.2018.01.009
- Roopashree, M. R., Gondhalekar, R. V., Shashikanth, M. C., George, J., Thippeswamy, S. H. & Shukla, A. (2010). Pathogenesis of oral lichen planus - a review: Pathogenesis of oral lichen planus. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 39 (10), 729–734. doi:10.1111/j.1600-0714.2010.00946.x
- Rose, N. R. (2004). Autoimmune Disease 2002: An Overview. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 9 (1), 1–4. doi:10.1111/j.1087-0024.2004.00837.x
- Salinas, G. F., Braza, F., Brouard, S., Tak, P.-P. & Baeten, D. (2013). The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease. *Clinical Immunology*, 146 (1), 34–45. doi:10.1016/j.clim.2012.10.005
- Santoro, A., Majorana, A., Roversi, L., Gentili, F., Marrelli, S., Vermi, W. et al. (2005). Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus. *The Journal of Pathology*, 205 (4), 426–434. doi:10.1002/path.1699
- Schinner, J., Cunha, T., Mayer, J. U., Hörster, S., Kind, P., Didona, D. et al. (2023). Skin-infiltrating T cells display distinct inflammatory signatures in lichen planus, bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *Frontiers in Immunology*, 14, 1203776. doi:10.3389/fimmu.2023.1203776
- Schmidt, T., Solimani, F., Pollmann, R., Stein, R., Schmidt, A., Stulberg, I. et al. (2018). TH1/TH17 cell recognition of desmoglein 3 and bullous pemphigoid antigen 180 in patients with lichen planus. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142 (2), 669-672.e7. doi:10.1016/j.jaci.2018.02.044
- Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M. et al. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *Journal of Cell Biology*, 174 (2), 169–174. doi:10.1083/jcb.200603161
- Solimani, F., Pollmann, R., Schmidt, T., Schmidt, A., Zheng, X., Savai, R. et al. (2019). Therapeutic Targeting of Th17/Tc17 Cells Leads to Clinical Improvement of Lichen Planus. *Frontiers in Immunology*, 10, 1808. doi:10.3389/fimmu.2019.01808
- Sprent, J. (1995). Antigen-Presenting Cells: Professionals and amateurs. *Current Biology*, 5 (10), 1095–1097. doi:10.1016/S0960-9822(95)00219-3
- The UniProt Consortium, Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S. et al. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51 (D1), D523–D531. doi:10.1093/nar/gkac1052
- Thewes, M., Stadler, R., Korge, B. & Mischke, D. (1991). Normal psoriatic epidermis expression of hyperproliferation-associated keratins. *Archives of Dermatological Research*, 283 (7), 465–471. doi:10.1007/BF00371784
- Valdimarsson, H., Thorleifsdottir, R. H., Sigurdardottir, S. L., Gudjonsson, J. E. & Johnston, A. (2009). Psoriasis – as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends in Immunology*, 30 (10), 494–501. doi:10.1016/j.it.2009.07.008

- Wang, L., Wang, F. & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine*, 278 (4), 369–395. doi:10.1111/joim.12395
- Wei, X., Fricker, K., Enk, A. H. & Hadaschik, E. N. (2016). Altered expression of keratin 14 in lesional epidermis of autoimmune skin diseases. *International Journal of Dermatology*, 55 (6), 620–628. doi:10.1111/ijd.13011
- Wenzel, J. (2015). Entzündliche Dermatosen mit Interface-Dermatitis. In L. Cerroni, C. Garbe, D. Metze, H. Kutzner & H. Kerl (Hrsg.), *Histopathologie der Haut* (S. 1–37). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-44367-5_9-1
- Yasuda, K., Takeuchi, Y. & Hirota, K. (2019). The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Seminars in Immunopathology*, 41 (3), 283–297. doi:10.1007/s00281-019-00733-8
- Yunusbaeva, M., Valiev, R., Bilalov, F., Sultanova, Z., Sharipova, L. & Yunusbayev, B. (2018). Psoriasis patients demonstrate HLA-Cw*06:02 allele dosage-dependent T cell proliferation when treated with hair follicle-derived keratin 17 protein. *Scientific Reports*, 8 (1), 6098. doi:10.1038/s41598-018-24491-z
- Zhang, Q., Hresko, M. E., Picton, L. K., Su, L., Hollander, M. J., Nunez-Cruz, S. et al. (2021). A human orthogonal IL-2 and IL-2R β system enhances CAR T cell expansion and antitumor activity in a murine model of leukemia. *Science Translational Medicine*, 13 (625), eabg6986. doi:10.1126/scitranslmed.abg6986
- Zhang, X., Yin, M. & Zhang, L. (2019). Keratin 6, 16 and 17—Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells*, 8 (8), 807. doi:10.3390/cells8080807
- Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*, 28 (1), 445–489. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212

7 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Lukas Flatz durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Lukas Flatz und Dr. Vincent Walter.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. Vincent Walter) von mir eigenständig durchgeführt.

Die Sammlung der Blutproben und die Isolierung der PBMCs erfolgte neben mir auch durch Sophie Thomä (2021-2022) und Jule Berkemer (ab April 2023).

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Meinen ersten Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. Flatz richten. Vielen Dank, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe zu absolvieren und für die hilfreichen Meetings.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Vincent Walter für die gute Betreuung und die große Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine Schwester Kathrin Hofmeister. Ich konnte sie immer alles fragen und sie stand mir stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite.

Zudem möchte ich mich bei Alica Nübling, Sophie Thomä und Jule Berkemer für die Hilfe bei der Gewinnung der Proben bedanken.

Ein Dank auch an alle aus der Arbeitsgruppe für die nette Aufnahme in die Gruppe und die Hilfe im Labor.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Basti und meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung und den Rückhalt bedanken.

9 Anhang

Anteile an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen aller

Stimulationen

Stimulationen mit Superpools

Tabelle 13: Ergebnisse der Stimulationen mit den Superpools aller Proben. Links sind die IDs der Patienten. Medium = IVS-Medium (Hintergrundreaktionen), CEF = CEF-Pool (Positivkontrolle), KRT = Keratin-Superpool, ADH = ADH-Superpool, PSO = PSO-Superpool. Die Zahlen bedeuten den Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen in %.

Patient	Medium	CEF	Superpool		
			KRT	ADH	PSO
LR_01	0,26	3,54	0,05	0,86	0,12
LR_02	0,04	4,75	0,01	0,22	6,19
LR_03	0,72	39,4	14,6	1,15	0,58
LR_04	0,98	4,23	1,24	0,87	2,15
LR_05	0,73	53	0,54	1,47	0,84
LR_06	0,31	36,7	0,06	0,12	0,2
LR_07	0,05	2,03	0,1	0,09	8,58
LR_08	0,63	26,7	23,6	2,47	1,98
LR_09	0,07	7,55	0,87	1,85	0,21
LR_10	0,3	33,2	1,97	1,33	0,59
LR_11	0,08	32,2	0,28	8,49	0,47
LR_12	0,04	15,5	0,3	0,24	0,11
LR_13	0,07	18,6	6,43	0,33	0,54
LR_14	0,03	18,5	10,5	1,19	0,18
LR_15	0,03	12,2	0,07	0,69	0,05
LR_16	0,1	60,4	2,04	0,27	4,13
LR_17	0,19	70,6	0,53	0,21	5,47
LR_18	0,03	14,7	0,03	0,03	0,01
LR_19	Keine Stimulation mit Superpools durchgeführt				
LR_20	Keine Stimulation mit Superpools durchgeführt				
LR_21	Keine Stimulation mit Superpools durchgeführt				
LR_22	Keine Stimulation mit Superpools durchgeführt				
LR_23	Keine Stimulation mit Superpools durchgeführt				
LR_24	0,42	16,2	8,06	4,51	0,43
LR_25	1,42	51	2,49	0,85	0,71
LR_26	0,15	49,2	0,25	0,22	1,09
LR_27	0,1	51,6	0,55	1,33	0,07
LR_28	0,38	57,3	0,59	0,63	3,86
LR_29	1,52	1,57	0,53	0,31	1,38
PS_01	0,01	9,54	0,02	0,06	0

Patient	Medium	CEF	Superpool		
			KRT	ADH	PSO
PS_02	0,08	5,61	0,05	0,14	0,09
PS_03	0,11	11,7	2,73	2,45	0,4
PS_04	0,1	7,64	0,19	0,11	0,15
PS_05	0,06	24,3	0,13	0,99	0,14
PS_06	0,01	4,47	0,03	0,09	0,01

Stimulationen mit Protein-spannenden Peptidpools

Protein-spannende Peptidpools aus Keratinen

Tabelle 14: Ergebnisse der Stimulationen mit den Protein-spannenden Peptidpools aus Keratinen aller stimulierten Proben (Keratine mit entsprechenden Nummern). Links sind die IDs der Patienten. Medium = IVS-Medium (Hintergrundreaktionen), Aktin = Aktin-Pool (Negativkontrolle), CEF = CEF-Pool (Positivkontrolle). Die Zahlen bedeuten den Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen in %.

Patient	Medium	Aktin	CEF	Keratin			
				1	2	5	
LR_03	0,21	0,06	22,5	0,02	0,03	0,12	
LR_08	0,36	0,17	0,32	0,69	0,13	0,26	
LR_10	0,78	1,83	43,9	1,08	0,28	3,27	
LR_13	0,16	0,12	11,8	0,35	0,9	0,34	
LR_14	0,02	0,02	31,8	0,11	0	0,01	
LR_16	0,026	0	30,7	0	0,3	0,01	
LR_19	0,026	1,66	60,3	0	0,04	0,03	
LR_20	0,86	0,09	2,02	0,68	0,43	0,86	
LR_21	1,62	0,97	3,84	2,18	0,06	0,26	
LR_22	0,56	0,41	21	0,24	0,39	0,3	
LR_23	0,01	0,15	0,02	0,1	0,04	0,17	
LR_24	0,94	1,58	13,4	0,11	0,51	1	
PS_03	0	0	9,63	0,29	0,08	0,51	
Patient	Keratin						
	6A	6B	6C	10	14	16	17
LR_03	0,34	0,12	0,26	0,13	0,25	0,81	0,33
LR_08	0,04	0,11	0,23	0,11	7,17	0,29	0,04
LR_10	Nicht stimuliert			1,01	1,09	Nicht stimuliert	
LR_13	0,05	0,21	0,88	1,02	2,11	0,46	0,04
LR_14	0	0	0,02	0	3,12	0,06	0
LR_16	0,01	0	0,01	0	0	0	0,02
LR_19	0,04	0,03	0,06	0,02	0,02	0,04	0,03
LR_20	0,02	0,33	1,35	0,57	0,93	0,82	0,58
LR_21	0,05	0,37	3,13	0,99	0,86	0,22	0,24
LR_22	0,82	0,54	0,47	0,37	0,48	0,43	0,69

Patient	Keratin						
	6A	6B	6C	10	14	16	17
LR_23	0,02	0,02	0,05	0,09	0,07	0,03	0,02
LR_24	0,45	0,49	0,25	1,13	0,98	1,13	0,46
PS_03	0,57	0,02	0,02	0,01	0,01	0	0,01

Protein-spannende Peptidpools aus Zelladhäsionsmolekülen

Tabelle 15: Ergebnisse der Stimulationen mit den Protein-spannenden Peptidpools aus Zelladhäsionsmolekülen aller stimulierten Proben. Links sind die IDs der Patienten. Medium = IVS-Medium (Hintergrundreaktionen), Aktin = Aktin-Pool (Negativkontrolle), CEF = CEF-Pool (Positivkontrolle). Dsg 1 = Desmoglein 1, Dsg 3 = Desmoglein 3, Dsc 3 = Desmocollin 3. Die Zahlen bedeuten den Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen in %.

Patient	Medium	Aktin	CEF	ADH-Molekül			
				BP180	Dsg 1	Dsg 3	Dsc 3
LR_05	0,66	0,49	33,8	0,83	0,32	0,55	0,7
LR_09	0,56	0,54	52,7	1,29	0,47	2,06	0,75
LR_10	0,78	1,83	43,9	0,56	1,6	1,65	0,22
LR_11	0,02	0,05	21,5	0	0,16	0,01	0,05
LR_24	0,94	1,58	13,4	2,48	0,28	6,38	0,23
LR_27	1,11	5	39,1	1,33	0,45	0,7	0,85
PS_03	0,34	0,17	36	0,89	0,74	0,6	9,6

Protein-spannende Peptidpools aus Psoriasis-Antigenen

Tabelle 16: Ergebnisse der Stimulationen mit den Protein-spannenden Peptidpools aus Psoriasis-Antigenen aller stimulierten Proben. Links sind die IDs der Patienten. Medium = IVS-Medium (Hintergrundreaktionen), Aktin = Aktin-Pool (Negativkontrolle), CEF = CEF-Pool (Positivkontrolle). Die beiden Psoriasis-Antigene LL-37 und ADAMTSL sind rechts zu sehen. Die Zahlen bedeuten den Anteil an IFN- γ + TNF- α + CD8+ T-Zellen in %.

Patient	Medium	Aktin	CEF	Psoriasis-Antigen	
				LL-37	ADAMTSL5
LR_02	0	Nicht stimuliert	1,48	0,2	0
LR_04	0,85	0,71	1,04	0	1,14
LR_07	0	0	9,29	0	0
LR_16	0,026	0	30,7	0,03	0
LR_17	0	0,05	31,7	0,03	0
LR_26	0,38	0,42	44	0,18	0,44
LR_28	0,31	0,56	46,5	0,19	0,8