

Aus der Hautklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Charakterisierung zirkulierender T-Zell-Subpopulationen bei Psoriasis

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von  
Kevin Löscher  
aus Rastatt

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Förstermann

Tag der Promotion: 07.02.2024



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
	<b>3.1 Psoriasis.....</b>	<b>5</b>
	<b>3.1.1 Klinik.....</b>	<b>5</b>
	<b>3.1.2 Pathogenese.....</b>	<b>7</b>
	<b>3.1.3 Therapie.....</b>	<b>10</b>
	<b>3.2 Das adaptive Immunsystem .....</b>	<b>11</b>
	<b>3.3 T-Zellaktivierung.....</b>	<b>12</b>
	<b>3.3.1 T-Zell Differenzierung .....</b>	<b>13</b>
	<b>3.3.2 Periphere Toleranz durch regulatorische T-Zellen .....</b>	<b>15</b>
	<b>3.4 Zusammenfassung .....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Material.....</b>	<b>19</b>
	<b>4.1 Laborgeräte .....</b>	<b>19</b>
	<b>4.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>19</b>
	<b>4.3 Allgemeine Reagenzien .....</b>	<b>19</b>
	<b>4.4 Puffer und Lösungen .....</b>	<b>20</b>
	<b>4.5 Antikörper.....</b>	<b>21</b>
	<b>4.5.1 Direkt konjugierte FACS-Antikörper .....</b>	<b>21</b>
	<b>4.5.2 Direkt konjugierte Isotyp-Antikörper .....</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>23</b>
	<b>5.1 Versuchsablauf.....</b>	<b>23</b>
	<b>5.1.1 Patienten- und Probandenrekrutierung .....</b>	<b>23</b>
	<b>5.1.2 PASI .....</b>	<b>26</b>
	<b>5.1.3 Studienablauf.....</b>	<b>26</b>
	<b>5.2 Isolation peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus Vollblut .....</b>	<b>28</b>

5.3	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung.....	29
5.4	Färbung der Zellen.....	29
5.4.1	Charakterisierung der T-Zell Subtypen .....	29
5.4.2	Extrazelluläre Färbung.....	30
5.4.3	Intrazelluläre Färbung .....	34
5.5	Durchflusszytometrie.....	34
5.5.1	T-Effektorzellen.....	35
5.5.2	Regulatorische T-Zellen .....	38
5.6	Statistische Auswertung.....	42
6	Ergebnisse .....	43
6.1	Zusammensetzung von PBMC und T-Zellen.....	43
6.1.1	Zusammensetzung CD3 <sup>+</sup> Zellen .....	43
6.1.2	CLA <sup>+</sup> Zellen .....	45
6.1.3	PASI-Korrelationen.....	46
6.2	Subpopulationen der T-Zellen .....	46
6.2.1	T-Effektorzellen und regulatorische T-Zellen .....	46
6.2.2	Korrelation von T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen.....	50
6.2.3	Vergleich von CLA <sup>+</sup> T-Effektorzellen.....	53
6.2.4	PASI-Korrelationen.....	56
6.2.5	Aktive T-Effektorzellen .....	59
6.3	CD45-Isoformen auf T-Zellen.....	60
6.3.1	CD45RA/RO <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	60
6.3.2	Aktivierungsstatus von T-Effektor und regulatorische T-Zellen.....	61
6.4	CTLA-4 und PD-1 <sup>+</sup> Zellen.....	64
7	Diskussion .....	67
8	Limitationen der Studie.....	79
9	Literaturverzeichnis .....	80
10	Abkürzungsverzeichnis.....	88

**11** **Abbildungsverzeichnis..... 90**

## **1 Zielsetzung**

Zielsetzung dieser Arbeit ist es die Zusammensetzung der T-Zellen sowie die Expression diverser Oberflächenmoleküle bei Psoriasis-Patienten zu untersuchen und diese mit Patienten nach systemischer Therapie sowie gesunden Probanden zu vergleichen. Durch die genaue Beschreibung der beteiligten Immunzellen sowie deren Veränderungen durch eine Therapie soll ein tieferes Verständnis über das Entzündungsgeschehen und die Pathogenese der Psoriasis erzielt werden.

## **2 Einleitung**

Psoriasis vulgaris stellt eine häufige Hauterkrankung dar, die die Menschen seit jeher begleitet. Schon im Alten Testament und in hippokratischen Schriften wurden die typischen Effloreszenzen beschrieben. Anfangs noch mit Lepra verwechselt, wurde sie im 19. Jahrhundert schließlich als eigene Erkrankung benannt (1). Seitdem gibt es in der Erforschung der Psoriasis große Fortschritte, wodurch die Lebensqualität der Betroffenen deutlich verbessert werden konnte. Heute stehen vor allem die immunologischen Prozesse und ihre möglichen Therapieansätze im Vordergrund.

### **2.1 Psoriasis**

Im Jahr 2013 setzte sich die Weltgesundheitsorganisation dafür ein, Menschen für das Thema Psoriasis als globales Gesundheitsproblem zu sensibilisieren. Mit einer Prävalenz von etwa 2,5% in Europa und Nordamerika zählt Psoriasis nämlich zu den häufigsten Dermatosen weltweit (2). Sie unterscheidet sich nicht zwischen den Geschlechtern, schwere Ausprägungen kommen jedoch häufiger bei Männern vor (3). Neben den Symptomen der Erkrankung selbst, sind es vor allem auch die Komorbiditäten, die mit einer Psoriasis einhergehen und die Lebensqualität der Patienten stark einschränken (4). So haben Patienten mit Psoriasis ein höheres kardiovaskuläres Risiko und leiden zum Beispiel häufiger an einer chronischen Niereninsuffizienz, nicht-alkoholischen Fettleber, Adipositas oder chronische entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (5). Nicht zuletzt geht die Erkrankung wegen ihres immer sichtbaren Erscheinungsbildes mit einer starken psychischen Belastung und der Entwicklung von Depressionen oder Angststörungen einher (6, 7). Die Pathogenese der Psoriasis ist bis heute Gegenstand der Forschung und es eröffneten sich in den letzten Jahren immer wieder neue Therapieoptionen zur systemischen Behandlung.

#### **2.1.1 Klinik**

Keratinozyten der Epidermis werden im Stratum basale gebildet, wandern während ihrer Teilung und Differenzierung in Richtung Oberfläche und flachen so lange ab, bis sie schließlich im Stratum corneum eine Schicht von flachen toten Zellen ohne Zellkern bilden. Dieser Zyklus dauert bei Gesunden 13 Tage und ist bei Psoriatikern aufgrund eines



entzündlichen Geschehens in der Haut um ein vielfaches beschleunigt (3, 8), sodass man in histologischen Schnitten betroffener Haut eine Akanthose (Verdickung der Epidermis), Hyperkeratose (verstärkte Verhornung der Haut) und Parakeratose (Zellen mit Zellkernen im Stratum corneum als Zeichen inkompletter Differenzierung) beobachtet (9-11).

Klinisch zeigen sich schließlich sogenannte erythemato-squamöse Plaques, bei denen scharf begrenzte Plaques mit groblamellären Schuppungen auf gerötetem Grund vorliegen. Die Hauterscheinungen gehen mit unterschiedlichen Ausprägungen einher, wobei die Plaque-Psoriasis, auch Psoriasis vulgaris genannt, mit etwa 90% die häufigste ist (10). Bevorzugte Prädispositionsstellen dieser Plaques stellen Streckseiten der Extremitäten, die periumbilicale und perianale Region, aber auch die behaarten Kopfhaut dar (7). Sie können vereinzelt oder flächig konfluierend auftreten und gehen mit einem Juckreiz (Pruritus) einher. Die Schuppen lassen sich leicht abtragen (Kerzentropfphänomen) und können punktförmige Blutungen (Auspitz-Phänomen) hinterlassen (12). Bis zu 30% der Patienten entwickeln auch eine Psoriasisarthritis mit sehr variablem klinischen Bild (13). Sowohl kleine als auch große Gelenke können symmetrisch oder asymmetrisch betroffen sein. Auch eine Beteiligung der Fingergelenke kann im Sinne einer Daktylitis vorliegen (14). Fast die Hälfte aller Patienten mit psoriatischen Hauterscheinungen und fast 90% aller mit Psoriasisarthritis zeigen auch eine Nagelbeteiligung mit subungualen Hyperkeratosen, die zur Abhebung (Onycholyse) und Dystrophie des Nagels führen können (15-17).

Da sich eine familiäre Häufung beobachten und diese in Zwillingsstudien mit erhöhter Konkordanz für eineiige gegenüber zweieiigen Zwillinge beweisen lässt, scheint es eine gewisse genetische Prädisposition zu geben (18). Tatsächlich wurden mehrere genetische Regionen beschrieben, darunter das am besten beschriebene PSORS1 (*psoriasis susceptibility 1*), welches mit dem HLA-Risikotyp HLA-Cw6 assoziiert ist (19). Sie allein reichen jedoch zum Ausbruch der Erkrankung nicht aus. Eine Vielzahl von Umweltfaktoren und äußeren Einflüssen triggern die Bildung von neuen Plaques. Neben Medikamenten können auch Infektionen, besonders Streptokokken- oder HIV-Infektionen, solche Trigger darstellen. Auch chemische oder mechanische Irritationen (Kratzen, Verletzung, Tattoo, Sonnenbrand) können in Phasen hoher Bereitschaft das Entstehen neuer Herde begünstigen. Weiterhin wurde auch Stress als wichtiger Auslöser beschrieben (20-22).

Neben der beschriebenen Psoriasis vulgaris gibt es noch weitere Verlaufsformen wie beispielsweise die Psoriasis guttata mit tropfenförmigen Herden oder Psoriasis inversa, die mit einem Befall von Hautfalten und Körperbeugen einhergeht. Befinden sich auf den psoriatischen Herden einzelne eitergefüllte Pusteln spricht man von einer Psoriasis pustulosa. Die Maximalvariante stellt schließlich die erythrodermische Psoriasis dar, die nahezu das gesamte Integument bedeckt und potenziell lebensbedrohlich ist. Verlauf und Ausprägung der Psoriasis zeigen also eine große Variabilität, sind individuell verschieden und treten schubweise mit Phasen von Aggravation und Phasen der Remission auf.

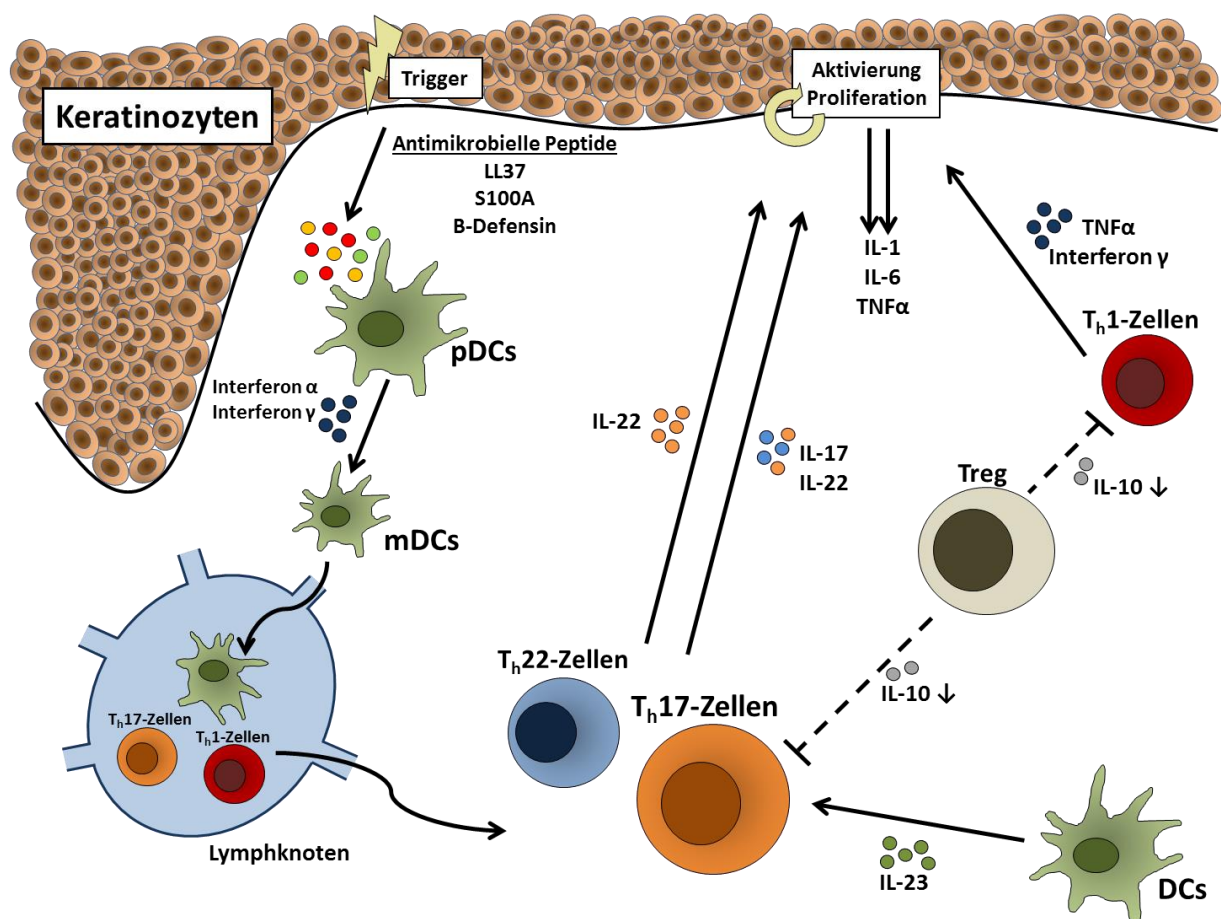
### **2.1.2 Pathogenese**

Die Pathogenese der Psoriasis ist komplex und bis heute nicht vollständig verstanden. Der Nachweis von Infiltraten aus DCs und T-Zellen im betroffenen Gewebe (23, 24) und die Tatsache, dass die Erkrankung bei Stammzelltransplantationen vom Spender auf den Empfänger übertragen werden kann (25), lassen vermuten, dass immunologische Prozesse für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Psoriasis essentiell sind. Oben genannte Trigger wie Traumata oder Infektionen (Köbnerphänomen) (26) können bei genetischer Prädisposition dazu führen, dass Keratinozyten der Epidermis antimikrobielle Peptide wie LL-37 (Cathelicidin),  $\beta$ -Defensin oder S100A (Psoriasin) freisetzen (27). Neben ihrer antimikrobiellen Funktion dienen sie auch als Chemokine und sind in der Lage, weitere Zellen zu aktivieren (28). LL-37 beispielsweise bildet mit DNS-Fragmenten anderer zerstörter Zellen einen Komplex, der wiederum von TLR9 plasmazytoider DCs erkannt wird und diese stimuliert (29). Die daraufhin induzierte Typ-1 Interferon-Sekretion aktiviert DCs, welche anschließend in Lymphknoten migrieren, um dort die Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen zu  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen zu initiieren (30). In dieser ersten Phase werden also die Grundsteine gelegt, die im weiteren Verlauf für ein entzündliches Milieu in der Haut sorgen. TLR7/8 Agonisten wie Imiquimod, die das Entstehen oder die Exazerbation einer Psoriasis herbeiführen können und daher in experimentellen Mausmodellen der Erkrankung Verwendung finden, bestätigen dies weiterhin (31). Inwieweit die Psoriasis als Autoimmunerkrankung gesehen werden kann, wird weiterhin kontrovers diskutiert. Das oben genannte antimikrobielle Peptid LL37 zum Beispiel gilt als potenzielles Autoantigen. So wurde sowohl in der Haut als auch im Blut eine Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität

und LL37-spezifischen T-Zellen beobachtet (32), die zudem vermehrt Homingrezeptoren der Haut wie das Cutaneous lymphocyte-associated antigen (*CLA*) exprimierten (33). Das mit HLA-C\*06:02 assoziierte Peptid ADAMTSL5 der Melanozyten scheint von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls als Autoantigen erkannt zu werden (34), genauso wie die von Keratinozyten exprimierten Proteine Keratin 17 und PLA2G4D (35, 36). Für die chronische Inflammation scheinen also auch autoimmune Prozesse eine Rolle zu spielen.

Gerade im Hinblick auf mögliche Therapieoptionen der Psoriasis gilt ein besonderes Augenmerk auch dem Zusammenspiel verschiedener Zytokine, die vom angeborenen und adaptiven Immunsystem sezerniert werden. Keratinozyten beispielsweise werden durch Interferon  $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17 oder IL-22 aktiviert und zur Teilung angeregt (7, 29). Sie selbst sezernieren neben Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden auch IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  (26, 37) und haben somit Einfluss auf weitere beteiligte Zellen. Interferon  $\gamma$ , TNF $\alpha$  und Typ I Interferone scheinen für das Entstehen des entzündlichen Milieus besonders wichtig zu sein (38, 39). Vor allem TNF- $\alpha$  wird von vielen Zellen freigesetzt, darunter auch Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen. Sie scheinen eine proinflammatorische Wirkung zu besitzen und induzieren die Produktion weiterer Mediatoren oder Adhäsionsmoleküle, die für das Entzündungsgeschehen von Bedeutung sind (40, 41). Die guten Erfolge der Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie untermauern die zentrale Rolle dieses Zytokins (42). Zum anderen scheint es jedoch auch eine gewisse anti-inflammatorische Wirkung zu geben, da bei wenigen Patienten die Anti-TNF $\alpha$ -Therapie zum Ausbruch der Psoriasis führte (43). Die Anwesenheit von T<sub>h</sub>1-typischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und IL-12 und die Abwesenheit von T<sub>h</sub>2-typischen Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-10) ließen vermuten, dass es sich bei der Entzündung um eine Typ-I-Reaktion handeln musste (44, 45). Tatsächlich rückte der Fokus jedoch zusätzlich auf IL-17 produzierende T<sub>h</sub>17-Zellen. So wurde beobachtet, dass IL-17-Boten-RNA vermehrt in läsionalen Hautarealen nachweisbar ist, nicht jedoch in Bereichen mit gesunder Haut (46). Neben T<sub>h</sub>17-Zellen sind auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen in der Lage, IL-17 zu sezernieren (47-50). IL-17 aktiviert Keratinozyten und induziert so sowohl die gesteigerte Proliferation und die daraus resultierende Hyperkeratose als auch die Sekretion von IL-6, IL-1 oder TNF- $\alpha$  (46, 51-53). IL-22 wird sowohl von T<sub>h</sub>17-Zellen als auch von neu beschriebenen T<sub>h</sub>22-Zellen freigesetzt und hat einen ähnlich regulierenden Effekt auf die Keratinozyten (53, 54). Da es in betroffener Haut vermehrt exprimiert wird und nach Remission wieder zurückbildet, scheint es für die Pathogenese der

Psoriasis ebenfalls von entscheidender Bedeutung zu sein (55). Den  $T_h17$ -Zellen vorgeschaltet scheint das Zytokin IL-23 zu sein, das für die Aktivierung, Proliferation und Aufrechterhaltung der  $T_h17$ -Zellen verantwortlich ist. Hauptquelle des IL-23 sind vor allem die durch Interferone aktivierten dendritischen Zellen (56). Diese IL-23/  $T_h17$ -Achse dient auch als Angriffspunkt für neue Therapien. Nicht zuletzt gibt es Hinweise, dass bei Psoriasispatienten auch die supprimierende Funktion der Tregs eingeschränkt ist. So zeigte sich bei Knockout-Mäusen mit verminderter Treg-Funktion eine Assoziation mit psoriasisformen Exanthenen (57). Auch eine verminderte Konzentration von IL-10, einem wichtigen Zytokin der Tregs zur Immunregulierung, wurde bei Psoriatikern beobachtet (58).



**Abbildung 1: Pathogenese von Psoriasis**  
 Von Keratinozyten sezernierte antimikrobielle Peptide dienen als potentielle Autoantigene und sind in der Lage, plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) zu aktivieren. Diese regen mit Hilfe von Interferon  $\alpha$  und  $\gamma$  myeloide dendritische Zellen (mDCs) dazu an, in Lymphknoten zu wandern und T-Zellen zu stimulieren. Die dadurch gereiften (autoreaktiven) T-Zellen migrieren anschließend zurück ins betroffene Gewebe und sorgen mit weiteren Zellen für die Aufrechterhaltung des entzündlichen Geschehens. Von besonderer Bedeutung ist die IL23/ $T_h17$ -Achse, welche die Aktivierung und Proliferation der Keratinozyten vorantreibt. Das von  $T_h1$ -Zellen sezernierte TNF  $\alpha$  und Interferon  $\gamma$  sowie das IL-22 der  $T_h17$ - und  $T_h22$ -Zellen unterstützen zusätzlich die Bildung des entzündlichen Milieus in der betroffenen Haut. Die inhibierende Funktion der Tregs durch IL-10 ist herabgesetzt.

### 2.1.3 Therapie

Die Behandlung der Psoriasis richtet sich nach dem Schweregrad der Erkrankung und den Komorbiditäten des Patienten. Eine milde Psoriasis wird in erster Linie mit lokalen Therapeutika behandelt. Topische Glucocorticoide werden von den meisten Patienten gut vertragen und bringen eine schnelle Besserung (59). Oft werden sie mit anderen Wirkstoffen kombiniert, wie zum Beispiel Salizylsäure, welche eine keratolytische Wirkung besitzt und für eine bessere Penetration der Glucocorticoide durch die Haut sorgt (60). Vitamin D3-Analoga wie Calcipotriol inhibieren T-Zellen und die Aktivität der Keratinozyten (61). Bei moderater Psoriasis kann zudem eine Phototherapie mit UVA- oder UVB-Strahlung zum Einsatz kommen (59).

Die Therapie einer schweren Psoriasis oder einer Psoriasis-Arthritis bedarf in der Regel einer systemischen Behandlung. Retinoide wie Acitretin sind mit dem Vitamin A-Molekül verwandt und in der Lage, die Teilungsrate der Keratinozyten zu normalisieren (62). Auch Fumarsäureester besitzen eine immunmodulierende und anti-inflammatorische Wirkung (63, 64). Durch die Inhibition der NF $\kappa$ B-Transkription können sie unter anderem die Aktivierung von T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>17-Zellen inhibieren (65, 66). Methotrexat (MTX), ein Folsäureanalogon, das durch Blockade der Purin- und Pyrimidinsynthese die DNA-Replikation hemmt, hat ebenfalls einen immunsupprimierenden Effekt (26). Besonders Patienten mit dem HLA-Cw6-Allel scheinen von dieser Therapie zu profitieren (67). Aus der Reihe der Immunsuppressiva wäre schließlich noch der Calcineurininhibitor Ciclosporin A zu nennen, der sich vor allem durch einen schnellen Rückgang des Exanthems auszeichnet (59).

Die neusten Errungenschaften der Psoriasisstherapie stellen die sogenannten Biologicals dar. Sie werden in der Regel subkutan oder i.v. verabreicht und greifen gezielt in bestimmte Entzündungskaskaden ein. TNF $\alpha$ -Inhibitoren waren die ersten dieser Art, die zur Psoriasisstherapie eingesetzt wurden. Sowohl monoklonale Antikörper wie Adalimumab oder Infliximab als auch das Fusionsprotein Etanercept zeigen sehr gute Ergebnisse, wobei es sich bei Eterncept um einen TNF $\alpha$ -Rezeptor handelt, der an den Fc-Teil eines IgG1-Antikörpers gebunden ist (68). Die jüngsten Wirkstoffe nehmen sich schließlich die IL-23/T<sub>h</sub>17-Achse zum Ziel. Secukinumab und Ixekizumab binden IL-17, während Brodalumab den IL-17-Rezeptor blockiert (69, 70). Ustekinumab richtet sich gezielt gegen die von DCs sezernierten Zytokine IL-23 und IL-12 und verhindert so die Aktivierung von T<sub>h</sub>17-Zellen (71). Einige Jahre nach

Beginn der Therapie wird jedoch in einigen Fällen die Bildung körpereigener Anti-Drug-Antikörper (ADA) beobachtet, die sich gegen die monoklonalen Antikörper richten und so die Wirksamkeit des Medikaments abschwächen. Nicht selten muss daher im Verlauf entweder die Dosis des Medikaments erhöht werden oder sogar ein Wechsel des Medikaments stattfinden (72).

## 2.2 Das adaptive Immunsystem

Das Immunsystem der Wirbeltiere zeichnet sich durch das Zusammenspiel eines angeborenen und adaptiven Immunsystems aus. Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen spezielle Mustererkennungsrezeptoren (*PRR*) wie Toll-like-Rezeptoren (*TLR*), NOD-like-Rezeptoren (*NLR*) oder RIG-1-like-Rezeptoren (*RLR*) und sind mit diesen in der Lage Pathogene, über sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*PAMPS*) oder schädigungsassoziierte molekulare Muster (*DAMPS*), zu erkennen. So gelingt zunächst eine Registrierung bakterieller und viraler Antigene und setzt unspezifische Abwehrmechanismen in Gang (73). Davon abzugrenzen ist die Fähigkeit des adaptiven Immunsystems Antigene spezifisch zu erkennen, so dass sie sowohl eine gezielte zelluläre und humorale Abwehr als auch ein immunologisches Gedächtnis gegen das Pathogen entwickeln (74). Im Folgenden sollen nun die Mechanismen des adaptiven Immunsystems, spezieller die der T-Zellen, im Vordergrund stehen.

Kommen in einem Gewebe Zellen des Immunsystems in Kontakt mit einem körperfremden Antigen, wird dieses auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex II (*MHC II*) an der Zelloberfläche präsentiert. MHC sind polymorphe Moleküle auf der Zelloberfläche und lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Während Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I auf nahezu allen Zellen exprimiert wird, um endogene Antigene zu präsentieren, wird die Klasse II nur von Zellen exprimiert, die in der Lage sind, exogene Antigene zu präsentieren (75). Die potentesten Vertreter dieser antigenpräsentierenden Zellen sind neben Makrophagen, Monozyten und B-Zellen vor allem als professionelle antigenpräsentierenden Zellen die dendritischen Zellen (DCs), welche für die T-Effektorzellantwort bedeutend sind (76). DCs dienen als Bindeglied zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem und können als einzige Zellen des Immunsystems naive T-Zellen aktivieren (77). Durch Aufnahme von Pathogenen oder anderer exogener

Substanzen (z.B. Allergene) werden die Antigenpräsentierenden Zellen aktiviert, so dass u.a. die Expression von kostimulierenden Molekülen und von Homing-Rezeptoren für Lymphknoten wie CCR7 (*Chemokine Receptor Type 7*) induziert wird(78). Das betroffene Gewebe wird von der Lymphe, einem Plasmafiltrat, durchspült und führt so unter anderem DCs über afferente Lymphgefäße zu den nächstgelegenen regionalen Lymphknoten. Hier treffen die DCs in der Parakortikalzone der Lymphknoten dann auf T-Zellen, die ihrerseits ständig über efferente Lymphgefäße ins Blut und von dort über hochendotheliale Venolen zurück in die Lymphknoten zirkulieren (79).

T-Zellen haben gemeinsam mit den B-Zellen ihren Ursprung im Knochenmark und reifen im Thymus zu naiven T-Zellen (80). Man unterscheidet im Wesentlichen CD4<sup>+</sup> (*Cluster of Differentiation 4*) und CD8<sup>+</sup> T- Zellen, wobei CD4<sup>+</sup> T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor mit MCH II Molekülen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen mit MHC I Molekülen der antigenpräsentierenden Zellen in Interaktion treten und Antigen-spezifisch aktiviert werden (81). T-Zell-Rezeptoren bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die während der T-Zell-Entwicklung durch zufällige Kombination verschiedener Gene generiert werden. Dieser als somatische Rekombination oder V(D)J-Rekombination bezeichnete Prozess gewährleistet eine hohe Variabilität dieser Rezeptoren, sodass sichergestellt werden kann, dass jedes präsentierte Antigen durch einen passenden T-Zell-Rezeptor erkannt werden kann (82, 83).

### **2.3 T-Zellaktivierung**

Die Bindung eines passenden T-Zell-Rezeptors an den MHC-II-Peptid-Komplex von DCs als professionelle antigenpräsentierenden Zellen ist schließlich der erste von drei Schritten zur Aktivierung einer naiven T-Zelle, dem sogenannten „priming“ (83). Damit es zur Differenzierung und Proliferation der naiven T-Zelle zur T-Effektorzelle kommt, bedarf es jedoch noch weiterer kostimulierender Signale. Für das zweite Signal spielen Oberflächenmoleküle der B7-Familie wie CD80 und CD86 eine wichtige Rolle (84). Diese befinden sich auf den antigenpräsentierenden Zellen und binden CD28, welches konstitutiv auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird. So unterstützen sie das Überleben und die Proliferation der T-Zelle (84, 85). Ein Fehlen dieses zweiten Signals würde die T-Zell-Reaktion unterdrücken und letztlich zur Anergie führen (86). Zusätzlich wird durch die Kostimulation auch die Expression von Interleukin-2 induziert, welches wiederum die Proliferation der bereits aktivierten T-Zellen fördert. Während vor der Aktivierung Interleukin-2 Rezeptoren

(auch: CD25) mit niedriger Affinität exprimiert werden, ist nach der Kostimulation die Affinität für den Liganden um ein Vielfaches höher. Dies wiederum fördert den verstärkenden Effekt des Interleukin-2 auf die Proliferation (87-89).

Ein direkter Gegenspieler dieses kostimulierenden Signals ist das CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*), welches sich auf der Oberfläche von T-Zellen befindet und strukturell mit CD28 verwandt ist. Während CD28 konstitutiv exprimiert wird, wird die Expression des CTLA-4 erst nach Aktivierung der T-Zelle hochreguliert (86). Es bindet ebenfalls CD80 / CD86, jedoch mit einer vielfach höheren Affinität als CD28 (86, 90) und besitzt einen gegenteiligen Effekt: während CD28 die Proliferation der T-Zelle fördert, verhindert CTLA-4 vielmehr die Stimulation, indem unter anderem die Interleukin-2 Synthese unterdrückt wird (91). CTLA-4 und CD28 konkurrieren also um CD80 / CD86 als Liganden, sodass CTLA-4 eine immunregulierende Aufgabe zukommt. CTLA-4-defiziente Mäuse unterstützen mit der Entwicklung ausgeprägter Autoimmunität diese These (92, 93).

Einen ähnlich hemmenden Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung hat der Rezeptor PD-1 (*Programmed Cell Death Protein 1*) der T-Zellen. Der Ligand dieses Rezeptors, PDL-1 (*Programmed Cell Death Ligand 1*) wird konstitutiv auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen und anderen nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert (94). Die Expression des PD-1 selbst jedoch wird erst nach Aktivierung der T-Zelle hochreguliert (95). Ihre Bindung löst in der T-Zelle intrazelluläre Kaskaden aus, die die Proliferation und Differenzierung der T-Zelle einschränken (96, 97). Wie CTLA-4 hat also auch PD-1 eine regulierende Funktion, welche sich durch PD-1-defiziente Mäusen mit autoimmunen Reaktionen belegen lässt (98, 99). Beide Moleküle regulieren so die induzierte Immunantwort, damit diese nicht überschießend wird (Negatives Feedback).

### **2.3.1 T-Zell Differenzierung**

Das dritte Signal geht schließlich von humoralen oder membrangebundenen Faktoren aus, die zur Differenzierung der naiven T-Zellen zu Subtypen der T-Effektorzellen beitragen und dementsprechend variabel sind (85). Welcher Weg der Differenzierung letztlich eingeschlagen wird, ist von der spezifischen Zusammensetzung der Zytokine abhängig, die auf die T-Zelle einwirken. So können sich durch Zytokine antigenpräsentierender Zellen bzw. aktivierter Zellen des angeborenen Immunsystems naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>h</sub>1-, T<sub>h</sub>2-, T<sub>h</sub>17-, T<sub>FH</sub>- oder induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg-Zellen) entwickeln (29). Für die



Differenzierung zur  $T_H1$ -Zelle müssen vor allem  $IFN-\gamma$  (*Interferon  $\gamma$* ) und  $IL-12$  (*Interleukin 12*) auf die Zelle einwirken. Sie starten eine Signalkaskade, bei der die Transkriptionsfaktoren  $STAT1$  (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) und  $STAT4$  phosphoryliert werden, welche dann den Transkriptionsfaktor T-bet aktivieren. Dieser setzt letztlich das Differenzierungsprogramm der  $T_H1$ -Zellen in Gang, das durch eigene  $IFN-\gamma$ -Produktion im Sinne einer positiven Rückkopplung wiederum gefördert wird (100). Die Mediatoren der  $T_H1$ -Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Viren oder anderen intrazellulären Bakterien (101).

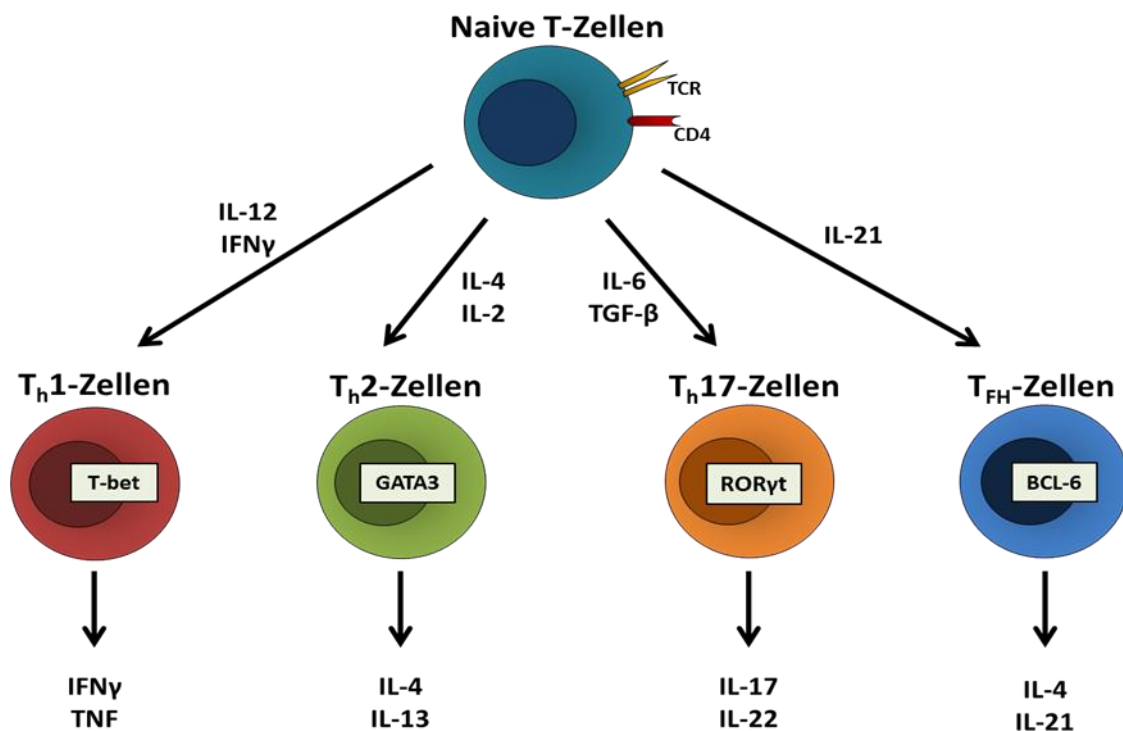


Abbildung 2: T-Zelldifferenzierung

Das Zytokinmilieu, das auf die naive T-Zelle während der T-Zellaktivierung einwirkt, stellt das dritte Signal dar und führt zur Differenzierung unterschiedlicher Subtypen von T-Effektorzellen. Die Zytokine lösen Signalkaskaden aus und aktivieren jeweils verschiedene Transkriptionsfaktoren, die letztlich die Differenzierung zu  $T_H1$ -,  $T_H2$ -,  $T_H17$ - oder  $T_{FH}$ -Zellen induzieren.

Bei Anwesenheit von  $IL-4$  und  $IL-2$  wird ein anderer Differenzierungsweg eingeschlagen. Durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren  $STAT6$  und  $GATA3$  kommt es zur Entwicklung von  $IL-4$  und  $IL-13$  produzierenden  $T_H2$ -Zellen (102, 103).  $T_H2$ -Zellen dominierte Immunreaktionen, die auch Typ-2-Reaktionen genannt werden, spielen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von extrazellulären Parasiten, in der Wundheilung und unterstützen B-Zellen beim Immunglobulin-Klassenwechsel zu  $IgE$ . Auch die Reaktionen der eosinophilen Granulozyten oder Mastzellen wird unterstützt, sodass eine Beteiligung bei der

Pathogenese von Allergien oder Asthma vermutet wird (104, 105). Um die Polarisation zu einem bestimmten Subtypen aufrecht zu halten, werden Signalwege der jeweils anderen T-Zell-Differenzierungen unterdrückt. So hemmt beispielsweise GATA-3 zusätzlich den für die T<sub>h</sub>1-Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor STAT4 und umgekehrt. Auch die von den T-Effektorzellen produzierten Zytokine verstärken ihre eigene Differenzierung und hemmen die der anderen Subtypen (106). Lange Zeit ging man von der Dichotomie dieser zwei Subtypen aus, wobei inzwischen weitere Differenzierungsgruppen der T-Zellen entdeckt wurden. T<sub>h</sub>17-Zellen entwickeln sich, nachdem TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) und IL-6 die Transkriptionsfaktoren STAT-3 und ROR $\gamma$ T (*RAR-related Orphan Receptor Gamma Thymus*) induzieren. Mit ihren sezernierten Entzündungsmediatoren IL-17 und IL-22 beteiligen sie sich an Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen (107, 108). Auch folliculäre T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>-Zellen) zeichnen sich durch ein eigenes Zytokinprofil aus. Induziert durch den Transkriptionsfaktor Bcl-6 (*B-cell Lymphoma 6 Protein*) setzen sie IL-21 frei. Ihnen kommt die Aufgabe zu mit B-Zellen zu interagieren und den Immunglobulin-Klassenwechsel anzuregen (109). Ob sie eine eigene Subpopulation der T-Effektorzellen oder nur einen Zustand der übrigen Subtypen darstellt, wird in der Literatur noch diskutiert (110). Die Differenzierung der T-Zelle ist nämlich keineswegs in Stein gemeißelt. Neure Daten zeigen vielmehr auf, dass T-Zellen eine gewisse funktionelle Plastizität besitzen und ihre Differenzierung unter dem Einfluss extrazellulärer Signale ändern können. So können T<sub>h</sub>17-Zellen beispielsweise durch Einwirkung von IL-12 und IL-23 und Aktivieren des Transkriptionsfaktors STAT1 ihre IL-17 Expression verlieren und sich zu T<sub>h</sub>1-Zellen differenzieren (108).

### **2.3.2 Periphere Toleranz durch regulatorische T-Zellen**

Damit sich das Immunsystem nicht gegen körpereigene Antigene oder kommensale Bakterien richtet, entwickelten sich Mechanismen, um überschießende Immunreaktionen und letztlich die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen oder Allergien zu limitieren. Jeder Mensch besitzt einen gewissen Prozentsatz autoreaktiver Zellen, die der Thymusselektion entgangen sind. Die Frequenz dieser Zellen wird durch Regulationsmechanismen begrenzt. Diese als immunologische Toleranz bezeichneten Mechanismen lassen sich prinzipiell in eine zentrale und periphere Toleranz unterteilen

(111). Die zentrale Toleranz entwickelt sich bereits während der T-Zell-Reifung im Thymus. Im Sinne einer positiven Selektion werden hier all jene T-Zellen selektiert, die in der Lage sind, MHC-Moleküle zu erkennen und mit mittlerer Affinität zu binden. Binden diese in einem zweiten Schritt, der sogenannten negativen Selektion, von Thymozyten präsentierte körpereigene Antigene, kommt es zur Deletion von Zellen mit hoher und geringer Affinität, um potentiell autoreaktive T-Zellen zu verhindern (112). Da nicht gewährleistet werden kann, dass trotz zentraler Toleranz potentiell autoreaktive T-Zellen den Thymus in Richtung Peripherie verlassen, greifen zur weiteren Kontrolle periphere Toleranzmechanismen. Hierzu zählt neben Deletion, Ignoranz und Anergie vor allem auch die Kontrolle durch regulatorische T-Zellen (113).

Bereits 1970 wurde zum ersten Mal von T-Zellen gesprochen, denen eine regulierende Funktion in der Immunantwort beikäme (114). 25 Jahre später, im Jahr 1995, wurden schließlich  $CD4^+CD25^+$  Lymphozyten als regulatorische T-Zellen (Tregs) (zuvor als Suppressorzellen) von Sakaguchi et al. definiert (115). Etwa 5-10% der im Blut zirkulierenden  $CD4^+$  T-Zellen sind Tregs und regulieren das Ausmaß der Immunreaktion (113, 116). Sie exprimieren konstitutiv und in großen Mengen den hochaffinen IL-2-Rezeptor CD25. Obwohl ein Zusammenhang zwischen der Stärke der CD25-Expression ( $CD25^{high}$ ) und der immunsupprimierenden Wirkung der Tregs beschrieben wurde (117), reicht dieser Marker zur alleinigen Beschreibung der Tregs jedoch nicht aus. Auch aktivierte konventionelle T-Zellen exprimieren nämlich CD25, wenn auch nicht konstitutiv (118). Regulatorische T-Zellen zeichnen sich zur weiteren Abgrenzung durch ihren intrazellulären Mastertranskriptionsfaktor Forkhead Box P3 (Foxp3) aus. Experimente an Mäusen mit fehlendem oder mutiertem Foxp3-Gen zeigten, dass Foxp3 für die immunregulierenden Eigenschaften der Tregs eine wesentliche Rolle spielt. Bei nicht voll funktionstüchtigem Foxp3 wären Autoimmunerkrankungen wie das lymphoproliferative Autoimmunsyndrom oder IPEX-Syndrom (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) die Folge (119, 120). Da eine inverse Korrelation zwischen der CD127- (IL-7-Rezeptor) und Foxp3-Expression herrscht, dient zusätzlich auch eine niedrige CD127-Expression ( $CD127^{low}$ ) als weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen Tregs und konventionellen T-Zellen, die den IL-7-Rezeptor wiederum in hohem Maße exprimieren (121). Da Experimente gezeigt haben, dass eine verminderte Foxp3-Expression auch die immunsupprimierende Eigenschaft der Tregs herabsetzt und diese sich sogar zu T-

Effektorzellen umwandeln können, wird diskutiert, ob es sich bei Tregs nicht vielmehr um die supprimierende Form eines bereits bekannten T-Zell-Subtyps handelt als um eine eigene Zellreihe (122, 123). Unabhängig davon, wo genau die Tregs zugeordnet werden, ist jedoch festzuhalten, dass  $CD4^+CD25^+Foxp3^+CD127^{low}$  T-Zellen immunregulierende Aufgaben zukommen.

Natürliche Tregs entstehen im Thymus und erhöhen bzw. erhalten ihre supprimierende Funktion in der Peripherie durch den Einfluss von IL-2 und TGF- $\beta$ . Neben den natürlichen Tregs (nTregs) wurden auch induzierbare Tregs (iTregs) beschrieben. iTregs haben ihren Ursprung nicht im Thymus, sondern lassen sich in der Peripherie aus konventionellen T-Zellen bilden. In Anwesenheit von TGF- $\beta$  oder IL-10 beginnen T-Zellen Foxp3 zu exprimieren und entwickeln sich so zu induzierten regulatorischen T-Zellen (124-126). IL-10 und TGF- $\beta$  selbst werden wiederum von Tregs sezerniert und haben zusammen mit IL-35 eine supprimierende Wirkung auf T-Effektorzellen (127). IL-2 hingegen wird von aktivierten T-Zellen in die Umgebung freigesetzt und dient eigentlich autokrin ihrer eigenen Aktivierung im Sinne eines positiven Feedbacks. Tregs fangen das IL-2 jedoch mit ihren hochaffinen IL-2-Rezeptoren CD25 ab, konkurrieren also mit den T-Effektorzellen um das IL-2 und dämpfen so diesen verstärkenden Effekt ein (123, 128, 129). Das IL-2 kann in den Tregs die Bildung von Adenosiden induzieren, die sezerniert werden, an  $A_{2A}$ -Rezeptoren der T-Effektorzellen binden und diese ebenfalls inhibieren (128, 129). Regulatorische T-Zellen sind auch dazu in der Lage durch Sekretion von Granzym A / Granzym B und Perforin die T-Zell-Aktivität durch Zytolyse einzudämmen (2). In direktem Zellkontakt über gap junctions können Tregs außerdem cAMP (*cyclisches Adenosinmonophosphat*) auf T-Effektorzellen übertragen und aktivierende Signalkaskaden verhindern (124, 130). Schließlich haben Tregs auch einen Einfluss auf DCs, die einen wesentlichen Beitrag zur T-Zellaktivierung leisten. Der oben beschriebene inhibierende Mechanismus durch CTLA-4 und PD-1 greift auch bei Tregs. Sie exprimieren beispielsweise konstitutiv CTLA-4 und können so das costimulierende Signal durch CD80/CD81 der DCs abschwächen (125).

## 2.4 Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit soll schließlich ein Beitrag zum besseren Verständnis des Entzündungsgeschehens geleistet werden. Die Pathogenese der Psoriasis wird maßgeblich

durch das Zusammenspiel von T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen bestimmt. Zur genaueren Untersuchung ihrer Zusammensetzung, Funktionalität sowie der Veränderungen durch eine systemische Therapie erfolgte an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz die Rekrutierung von Psoriasis Patienten mit einem PASI > 10. Vor sowie drei Monate nach Beginn einer systemischen Therapie wurden aus dem Vollblut dieser Patienten periphere mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert, welche im Anschluss durch Färbung intra- und extrazellulärer Marker mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht wurden. Selbiges wurde mit gesunden Probanden als Vergleichsgruppe durchgeführt. Dabei zeigte die Gruppe der Psoriasis-Patienten in der FACS-Analyse eine deutliche Erhöhung von T<sub>h</sub>1-, T<sub>h</sub>2- sowie T<sub>h</sub>17-Zellen, welche den skin-homing Rezeptor kutanes Leukozyten-Antigen (CLA) exprimieren. Hierdurch wurde deutlich, dass bei erkrankten Patienten verstärkt T-Zellen im Entzündungsgeschehen der Haut involviert sind als in den Kontrollgruppen. Vor allem T<sub>h</sub>17-Zellen präsentieren sich bei hoher Expression des Oberflächenmoleküls CD45RO in einem aktiven Zustand. Der hohe Anteil von naiven CD45RA<sup>+</sup> Zellen unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Psoriasis-Patienten hingegen lässt eine Rekrutierung weiterer unreifer T-Zellen vermuten, welche in die Entzündungsreaktion der Haut involviert werden sollen. Auch regulatorische T-Zellen präsentierten sich mit einer erhöhten Expression von CD45RO und lassen so einen aktivierten Zustand dieser Zellen vermuten. Ihr Anteil korreliert zudem mit der Zahl der T<sub>h</sub>1 und T<sub>h</sub>17-Zellen. Somit ist in Zusammenschau mit der Tatsache, dass bei Psoriasis-Patienten mehr Tregs nachgewiesen werden konnten als in den übrigen Gruppen, ein positiver Feedbackmechanismus zu diskutieren, welcher der autoimmunen Reaktion durch T-Effektorzellen Einhalt gebieten soll. Auch die gesteigerte Expression von inhibierenden Faktoren wie PD-1 und CTLA-4 durch die regulatorischen T-Zellen in der Gruppe der betroffenen Patienten kann als positiver Feedbackmechanismus gewertet werden.

### 3 Material

#### 3.1 Laborgeräte

Autoklav	H + p Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland LSR II, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Software	Diva 6.0, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Lichtmikroskop	Dialux, Leitz, Wetzlar, Deutschland
Sterilibank	HeraSafe, Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland
Wasserbad	Julabo TW 12, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer, Merck, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 3L-R, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland

#### 3.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Glaspipette	10ml Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	10µl/100µl/200µl/1000µl, Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einmalspritzen	Braun Omnifix 10ml/20ml, Melsungen, Deutschland
Wellplatte	Greiner bio-one, PS-Microplate, 96well

#### 3.3 Allgemeine Reagenzien

Aqua dest.	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll	Lymphozytenseparationsmedium, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
HSA (20%)	Humanes Serum Albumin, Pharmacia, Erlangen, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland

DMSO Fixation/Permeabilization Concentrate	Dimethylsulfoxid, eBioscience, San Diego, CA
Fixation/Permeabilization Diluent	eBioscience, San Diego, CA
Permeabilization Buffer 10X Lymphozytenseparationsmedium	eBioscience, San Diego, CA Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

### 3.4 Puffer und Lösungen

1x PBS-Puffer	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in Aqua dest., pH-Wert 7,2
FACS-Puffer	1x PBS-Puffer 2,5 % HSA (20 %) 3mM EDTA
Trypanblau-Lösungen	1x PBS-Puffer 0,4 % Trypanblau
HSA/DMSO-Lösung	HSA (20 %) 20 % DMSO
Fixierungs-/Permeabilisierungs- Lösung	25 % FP-Konzentrat 75 % FP-Dilurent
Permeabilisierungspuffer	Aqua dest. 10 % Permeabilisierungspuffer

## 3.5 Antikörper

### 3.5.1 Direkt konjugierte FACS-Antikörper

Spezifität Human	Konjugat	Klon	Antikörper- Klasse	Verdünnung	Bezugsquelle
CD3	APC-Cy7	HIT3a	Maus IgG2a,κ	1:20	BioLegend #300317
CD4	PerCP-Cy5.5	OKT4	Maus IgG2b,κ	1:20	BioLegend #317428
CD25	Brilliant Violet 421	BC96	Maus IgG1,κ	1:10	BioLegend #302630
CD45RO	APC Cy7	UCHL1	Maus IgG2a, κ	1:20	BioLegend #304228
CD45RO	Brilliant Violet 510	UCHL1	Maus IgG2a,κ	1:3	BioLegend #304246
CD45RA	Brilliant Violet 711	HI100	Maus IgG2b,κ	1:200	BioLegend #304138
CD45RA	PE-Cy7	HI100	Maus IgG2b,κ	1:5	BioLegend #304125
CD152 (CTLA-4)	FITC	14D3	Maus IgG2a,κ	1:4	eBioscience #11-1529-42
CD127	APC-eFluor 780	eBioRDR5	Maus IgG1,κ	1:10	eBioscience #47127842
CD183 (CXCR3)	FITC	G025H7	Maus IgG1,κ	1:10	BioLegend #353704
CD194 (CCR4)	PE-Cy7	L291H4	Maus IgG1,κ	1:5	BioLegend #359409
CD196 (CCR6)	Brilliant Violet 510	G034E3	Maus IgG2b,κ	1:5	BioLegend #353424
CD279 (PD-1)	Brilliant Violet 711	EH12.2H7	Maus IgG1,κ	1:10	BioLegend #329928
CCR10	APC	6588-5	Armenian Hamster IgG	1:5	BioLegend #341506
CLA	PE	HECA-452	Ratte IgM	1:5	Miltenyi #130091635
CLA	APC	HECA-452	Ratte IgM	1:4	Miltenyi #130098573
Foxp3	PE	PCH101	Ratte IgG2a,κ	1:2	eBioscience #12477642

**Tabelle 1**  
**Auflistung direkt konjugierter Antikörper mit verwendeter Verdünnung**



### 3.5.2 Direkt konjugierte Isotyp-Antikörper

Spezifität Human	Konjugat	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
ms-IgG1,κ	PECy7	MOPC-21	1:5	BioLegend #400126
mSIgG1,κ	FITC	MOPC-21	1:10	BioLegend #400110
mSIgG2b,κ	Brilliant Violet 510	MPC-11	1:5	BioLegend #400345
hamIgG,κ	APC	HTK888	1:5	BioLegend #400911
ratIgG2a	PE	R35-95	1:2	BD Pharmingen

**Tabelle 2**

**Auflistung direkt konjugierter Isotyp-Antikörper mit verwendeter Verdünnung**

## **4 Methoden**

### **4.1 Versuchsablauf**

Die Studie wurde nach Genehmigung der Ethikkommission und der Unterstützung durch Pfizer Inc. in der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Um die Zusammensetzung und Veränderungen der T-Zell Subpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu bestimmen, wurde das Blut von Psoriasis-Patienten vor und drei Monate nach Beginn einer systemischen Therapie untersucht. Zudem wurden auch gesunde Probanden in die Studie aufgenommen, um das Blut Gesunder und betroffener Patienten miteinander vergleichen zu können und um zu klären, ob sich die Ergebnisse nach systemischer Therapie denen gesunder Probanden angleichen. Im Folgenden sollen nun die Rekrutierung der Patienten und Probanden sowie der genaue Studienablauf erläutert werden.

#### **4.1.1 Patienten- und Probandenrekrutierung**

Die Patienten für die Studie wurden durch die Privat- und Psoriasis-Sprechstunde der Hautklinik Mainz rekrutiert. Ein entsprechendes Ethikvotum der Ethikkommission Rheinland-Pfalz lag vor. In Frage kamen hierfür volljährige Männer und Frauen, die zu diesem Zeitpunkt eine Psoriasis vulgaris aufwiesen und systemisch behandelt werden sollten. Die letzte systemische Therapie sollte dabei mindestens drei Monate zuvor beendet worden sein. Damit sollte sichergestellt werden, dass die später untersuchten T-Zellen keinem Einfluss von immunmodulierenden Wirkstoffen ausgesetzt sind. Der bisherige Krankheitsverlauf sowie die bis dahin erfolgte lokale und systemische Therapie der Patienten wurden in einem Fragebogen festgehalten. Weiterhin wurden auch Nebendiagnosen dokumentiert, wobei besonders auf Psoriasis assoziierte Erkrankungen wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Malignome, kardiovaskuläre oder psychiatrische Erkrankungen geachtet wurde. Besonderes Augenmerk galt zudem Erkrankungen, die in irgendeiner Form Einfluss auf das Immunsystem besitzen und die späteren Ergebnisse somit verzerren könnten. Dazu zählten neben Autoimmunerkrankungen oder Allergien auch aktuelle Infektionserkrankungen, die schließlich allesamt zu einem Ausschluss aus der Studie führten. Patienten mit allergischen Erkrankungen, die saisonbedingt zum Zeitpunkt der Rekrutierung keine Krankheitsaktivität aufzeigten (z.B. im Dezember rekrutierte Patienten mit Pollenallergie), konnten allerdings unter Vorbehalt an der Studie teilnehmen. Neben

Erkrankungen, die mit einer gesteigerten Aktivität des Immunsystems einhergehen, galt auch eine immunsupprimierende Medikation als Ausschlusskriterium. Die genaue Erfassung des Medikamentenplans sollte weiterhin mögliche Psoriasis auslösende Wirkstoffe wie ACE-Hemmer, Betablocker oder NSAR ins Blickfeld rücken. Gesunde Probanden wurden zusätzlich rekrutiert, wobei für sie dieselben Bestimmungen bezüglich Medikation und Begleiterkrankungen galten wie für die Psoriasis-Patienten. Beim Einschluss der Probanden wurde weiterhin darauf geachtet, dass die Gruppe der gesunden Probanden Hinblick auf Alter und Geschlecht der Gruppe der Psoriatiker ähnelt, um ein entsprechendes „Matching“ zu erzielen. So gab es unter den gesunden Probanden neun Männer und elf Frauen mit einem Altersdurchschnitt von 46 Jahren, bei den Psoriasis-Patienten 12 Männer und sieben Frauen und einem Altersdurchschnitt von 48 Jahren.

<b>Probanden mit Psoriasis</b>	<b>Geschl.</b>	<b>Alter</b>	<b>PASI</b>	<b>Therapie</b>	<b>PASI, falls Follow-up stattgefunden hat</b>
AG25	m	37	28,6	Adalimumab	-
AL28	w	63	11,7	Adalimumab	0
AT19	w	58	24,0	Adalimumab	24
BL18	m	54	11,6	MTX	0
CA24	w	39	16,7	Adalimumab	5
EG31	m	70	24	-	-
FE37	m	71	22,3	MTX	0
FT20	m	56	15,4	MTX	0
HM32	m	57	34,4	-	-
JS35	m	22	15,1	-	-
LJ33	w	47	13,8	-	-
MS22	m	35	10,8	Adalimumab	0
MS34	m	24	14	MTX	0
MT23	m	31	13,2	Adalimumab	0
RK27	w	57	27	Ciclosporin A	0
RM26	m	59	36,9	MTX	0
RZ36	w	51	15	-	-
SS21	w	39	10,9	Adalimumab	0
AD29	m	56	50	MTX	-

<b>Gesunde Probanden</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>
h#1	m	31
h#2	w	53
h#3	w	35
h#4	w	69
h#5	m	68
h#6	w	55
h#7	m	18
h#8	m	25
h#9	m	29
h#10	w	66
h#11	m	50
h#12	w	45
h#13	m	49
h#14	w	72
h#15	w	35
h#16	m	43
h#17	m	33
h#18	w	53
h#19	w	45
h#20	w	46

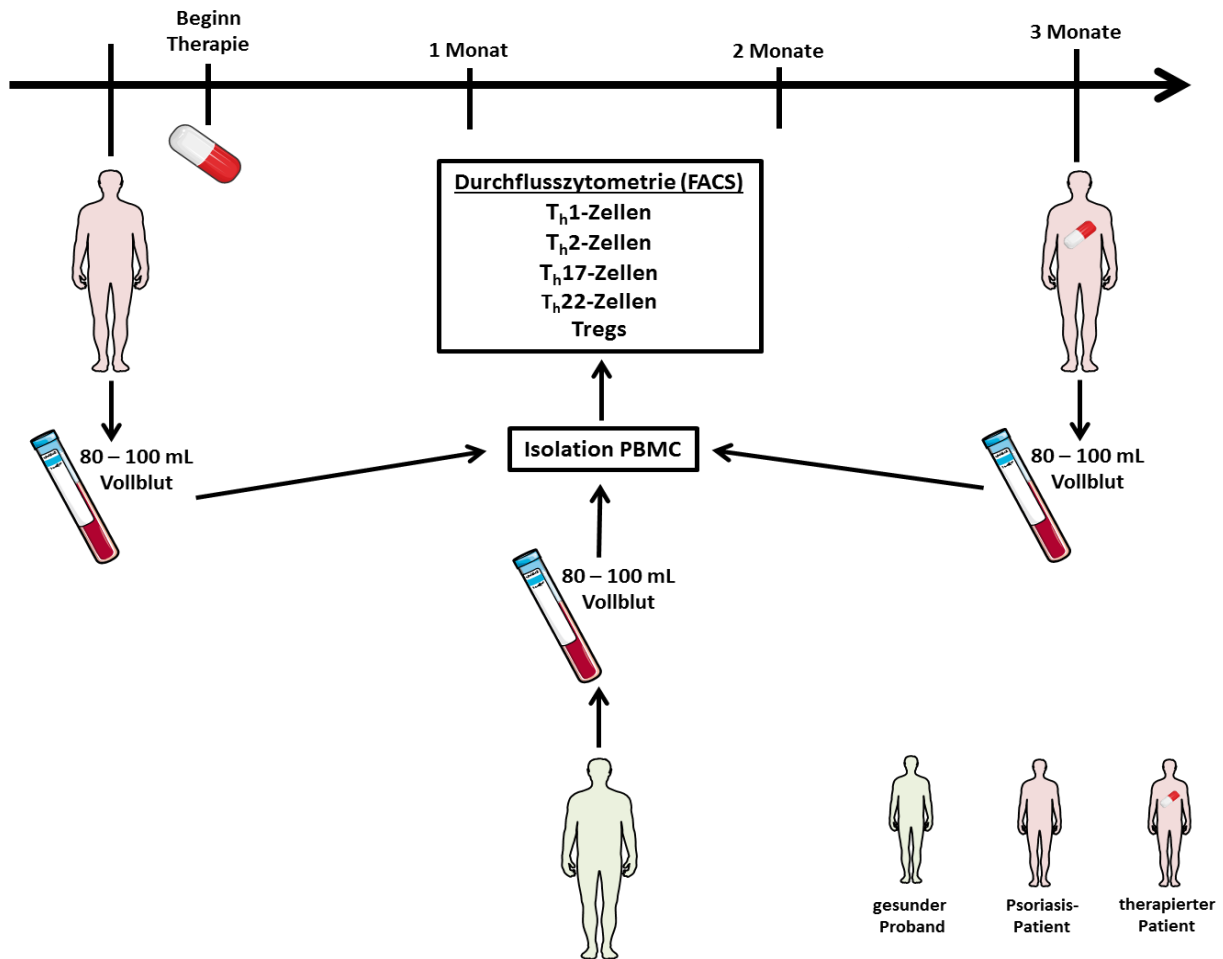
**Tabelle 3: Tabellarische Auflistung der Probanden mit Psoriasis (n=19) und der gesunden Probanden (n=20). m= männlich, w= weiblich.**

#### **4.1.2 PASI**

Um die T-Zellen der Patienten mit denen gesunder Probanden gut vergleichen zu können und um nach systemischer Therapie einen messbaren Unterschied ermitteln zu können, sollten die Patienten vor der Therapie einen gewissen Schweregrad der Erkrankung aufweisen. Um diesen objektiv beurteilen zu können wurde der PASI (Psoriasis Area and Severity Index) herangezogen. Hierbei werden die Symptome Erythem, Schuppung und Infiltration für die vier Körperregionen Kopf, Rumpf, Arme und Beine ermittelt, wobei für das jeweilige Symptom zwischen null Punkten (keine Beteiligung) und maximal vier Punkten (schwere Beteiligung) vergeben werden können. Die Punkte werden für jeweils alle drei Symptome bestimmt und für jede Körperregion getrennt summiert. Parallel erfolgt auch eine Abschätzung der betroffenen Oberfläche der jeweiligen Körperregionen. Auch hier werden null (keine Beteiligung) bis maximal sechs Punkte (90 bis 100 % befallen) verteilt. Diese Punktzahl wird für jede Körperregion getrennt mit der Summe der Symptome multipliziert, wobei anschließend jedes Produkt mit einem speziellen Gewichtungsfaktor multipliziert wird (Kopf: 0,1; Arme: 0,2; Rumpf: 0,3; Beine: 0,4). Die Summe der so für jede Körperregion erhaltenen Zahl entspricht schließlich dem PASI. Der Maximalwert des Scores beträgt 72, für die Studie wurden jedoch Patienten gesucht, die einen PASI von mindestens 10 oder mehr besaßen.

#### **4.1.3 Studienablauf**

Nach der Erhebung aller relevanten Daten und der Errechnung des PASI wurden 19 Patienten 80 bis 100 mL Vollblut entnommen, um PBMC zu isolieren und T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu untersuchen. Selbiges galt auch für die gesunden Probanden (n=20). Drei Monate nach Beginn der systemischen Therapie wurden die Patienten erneut vorgestellt, wobei von den 19 Patienten nur noch 12 untersucht wurden. Gründe waren hierfür jeweils ein Umzug des Patienten und der vorzeitige Abbruch oder stark verzögerter Beginn der Therapie. Bei den meisten Patienten zeigte sich eine komplette Remission des Psoriasischubs. Nach Ermittlung eines neuen PASI, wurde der Prozess wiederholt, sodass ein Vergleich mit den drei Monate zuvor erhobenen Daten angestellt werden konnte.

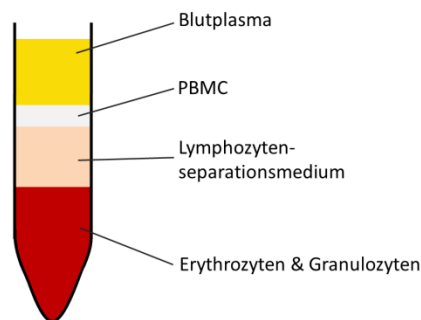


**Abbildung 3: Versuchsaufbau**

Entnahme von 80 – 100 mL Vollblut von gesunden Probanden (n=20), Psoriasis-Patienten mit einem PASI  $\geq$  10 vor Beginn einer systemischen Therapie (n=19) und drei Monate nach der Therapie (n=12). Mit den daraus isolierten PBMC wurden schließlich Subpopulationen der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht.

## 4.2 Isolation peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus Vollblut

Den Patienten und Probanden wurden mit 10 ml Spritzen (200 µl Heparin pro Spritze) jeweils 80 ml venöses heparinisiertes Vollblut abgenommen. Dieses wurde gleichmäßig in vier 50 ml Zentrifugationsröhrchen auf 15 ml Lymphozytenseparationsmedium überschichtet. Nach 25-minütiger Zentrifugation (25 °C, 350 g, ohne Bremse) ließen sich dann mehrere Phasen unterscheiden: Ganz unten befanden sich die durch ihre hohe Dichte herabzentrifugierten Erythrozyten und Granulozyten (z.B. eosinophile oder neutrophile Granulozyten) und darüber das Lymphozytenseparationsmedium. Die ringförmige Interphase darüber enthielt die interessierten Lymphozyten und weitere mononukleäre Zellen (PBMC; engl. peripheral blood mononuclear cells), während die oberste Schicht schließlich das Blutplasma bildete.



**Abbildung 4: Isolation der PBMC**  
Verschiedene Phasen nach Zentrifugation des Vollblutes.

Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein separates 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, welches dann mit eiskaltem 1 x PBS (4 °C) aufgefüllt wurde. Nach Zentrifugation (10 min, 350g, 4 °C, mit Bremse) und anschließendem Dekantieren (1. Waschen) wurde der Waschvorgang so oft wiederholt, bis der Überstand klar und frei von Thrombozyten war. Die so aufgereinigten PBMC konnten dann zur Färbung verwendet werden.

### 4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung

Die übrig gebliebenen Zellen wurden nach dem letzten Waschvorgang mit 15 mL PBS (4°) aufgenommen. Sowohl die Zellzahl als auch die Viabilität der Zellen ließen sich mit Hilfe der Trypanblau-Färbung bestimmen. Während die Zellmembran bei lebenden Zellen noch intakt ist und den sauren Farbstoff Trypanblau nicht durchlässt, ist die Durchlässigkeit bei toten Zellen erhöht. So erschienen unter dem Mikroskop tote Zellen dunkelblau gefärbt, lebende Zellen hingegen weiß-durchsichtig. Für die Färbung der PBMC wurde eine Verdünnung von 1:10 angesetzt. 20 µl der Zellsuspension wurden also mit 180 µl Trypanblau-Lösung in einer 96 well-Platte vermischt und 10 µl davon in eine entsprechende Zählkammer gefüllt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte dann anhand folgender Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = X * Y * Z * 10^4$$

*X = Lebendzellzahl in einem Quadranten*

*Y = Verdünnung*

*Z = Volumen der Zellsuspension*

Durch die Ermittlung der Gesamtzellzahl konnte nach einem weiteren Zentrifugationsschritt so viel FACS-Puffer hinzugegeben werden, sodass sich in 100 µl Zellsuspension genau  $1 \times 10^6$  Zellen befanden. Dies erleichterte schließlich die darauffolgenden Pippetierschritte.

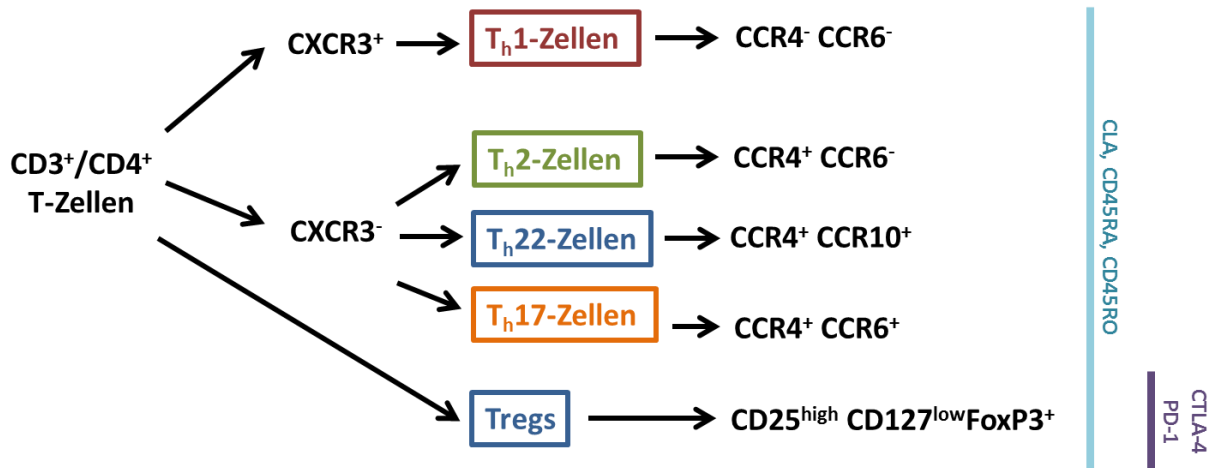
## 4.4 Färbung der Zellen

### 4.4.1 Charakterisierung der T-Zell Subtypen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können naive T-Zellen abhängig vom Zytokinmilieu, das auf sie einwirkt, verschiedene Differenzierungswege einschlagen. Dabei unterscheiden sich die jeweiligen T-Zell-Subtypen nicht nur in ihren Mastertranskriptionsfaktoren oder freigesetzten Entzündungsmediatoren, sondern auch durch exprimierte Selektine, Chemokinrezeptoren und Integrine. Diese Homing-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Migration der Zellen in das jeweilige Zielorgan und können wegen ihrer individuellen Expression als weiteres Unterscheidungsmerkmal der Subpopulationen herangezogen werden (131). So würden  $T_H1$ -Zellen CXCR3 exprimieren, nicht jedoch CCR4 oder CCR6.  $T_H2$ - und  $T_H17$ -Zellen exprimieren hingegen kein CXCR3 und seien im Falle der  $T_H2$ -Zellen  $CCR4^+CCR6^-$  und  $T_H17$ -Zellen  $CCR4^+CCR6^+$  (132-134). Auch  $T_H22$ -Zellen lassen sich durch diese Chemokinrezeptoren charakterisieren. So exprimieren sie zwar



CCR10 und CCR4, nicht jedoch CXCR3 (135). Die regulatorischen T-Zellen zeichnen sich im Wesentlichen durch eine hohe Expression von CD25 und dem intrazellulären Transkriptionsfaktor Foxp3, sowie durch eine niedrige CD127-Expression aus.



**Abbildung 5 Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen**  
Schematische Darstellung der individuellen Expression von Oberflächenmolekülen und Transkriptionsfaktoren, die zur Charakterisierung der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen herangezogen wurden.

Zur genaueren Beschreibung der einzelnen Subpopulationen wurde ferner das „cutaneous lymphocyte-associated antigen“ CLA angefärbt. Dieses Adhäsionsmolekül befindet sich auf der Oberfläche von Immunzellen, ist für die Zellmigration von Zellen in die Haut verantwortlich und erlaubt somit eine Zuordnung zu T-Zellen, die tatsächlich die Haut infiltrierten (136). Weiterhin wurde bei allen Zellen noch die Tyrosinphosphatase CD45, auch „leukocyte common antigen“ genannt (137), gefärbt. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Stimulierung der T-Zellen und gibt Aufschluss über den Aktivierungs- und Differenzierungszustand der T-Zellen. Man unterscheidet dabei zwei Isoformen, CD45RA und CD45RO, wobei CD45RA überwiegend von naiven T-Zellen exprimiert wird, welches dann nach Aktivierung der Zelle durch alternatives Splicing durch CD45RO ersetzt wird (138).

Um ein genaueres Bild über die immunregulierende Funktion der Tregs zu bekommen, wurden zusätzlich noch die Marker PD-1 und CTLA-4 untersucht, wobei CTLA-4 intrazellulär angefärbt wurde. Denn fast 90% des CTLA-4 befindet sich in intrazellulären Vesikeln von Foxp3<sup>+</sup> Tregs oder aktivierten konventionellen T-Zellen (139, 140).

#### 4.4.2 Extrazelluläre Färbung

Die aufgereinigten PBMC wurden schließlich auf eine Mikrotiterplatte übertragen, wobei für die Färbung der T-Effektorzellen drei Vertiefungen á 1 x 10<sup>6</sup> Zellen verwendet wurden, für

die der regulatorischen T-Zellen fünf á  $2 \times 10^6$  Zellen. Die doppelte Zellzahl für die Färbung der Tregs begründet sich in der zusätzlichen intrazellulären Färbung und soll nach Abschluss aller Färbungsschritte eine ausreichende Zellzahl gewährleisten. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 350 g und 4 °C mit Bremse konnte der überschüssige Puffer dekantiert werden, sodass die verbliebenen Zellen mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert werden konnten. Für die T-Effektorzellen wurden hierfür jeweils 20 µL eines Antikörper-Mix verwendet, der CD4 (PerCP-Cy5.5), CD3 (BV650), CD25 (BV421), CLA (PE) und FACS-Puffer zur Auffüllung verbleibender Volumina beinhaltet. Auch in die fünf Vertiefungen der Tregs wurden jeweils 20 µL eines Antikörpermix hinzugefügt. Neben den oben aufgelisteten Markern CD3, CD4 und CD25 sind weiterhin CD127 (eFluor780) und CLA (APC) Bestandteil gewesen. Zur späteren Auswertung mit sogenannten Fluoreszenz minus one (FMO)-Kontrollen wurden von den fünf Vertiefungen jeweils eines mit einem Mix ohne CLA und ein weiteres ohne CD127 inkubiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C und unter Lichtabschluss wurden allen Zellen jeweils 150 µL FACS-Puffer dazugegeben, um nach erneuter dreiminütiger Zentrifugation (4 °C, 350g, mit Bremse) den Überstand zu dekantieren.

Dieser Schritt wiederholte sich mit einem zweiten Mix an Antikörpern. Die drei Vertiefungen für die T-Effektorzellen bekamen jeweils 20 µL einer anderen Zusammensetzung von Antikörpern. Eine beinhaltet nun alle Antikörper für die Chemokinrezeptoren wie CCR4 (PECy7), CXCR3 (FITC), CCR6 (BV510) und CCR10 (APC) sowie die Marker CD45RO (APC Cy7) und CD45RA (BV711). Eine weitere Vertiefung wurde zur FMO ohne CD45RO und CD45RA inkubiert und der Mix für die letzte Vertiefung beinhaltet schließlich statt der Antikörper für Chemokinrezeptoren die entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper mit entsprechender Fluoreszenz. Die Isotypkontrollen spielen eine wichtige Rolle in der späteren Gating-Strategie bei der Auswertung der Ergebnisse. Da Antikörper auch unspezifisch mit ihrem Fc-Anteil an Zellen binden können, können sie als „Hintergrundsignal“ falsch positive Ergebnisse liefern. Durch die Spezifität der Isotypkontroll-Antikörper für Antigene, die in den Zellen nicht vorhanden sind, können sie somit als Negativkontrolle dienen. Eine unspezifische Bindung würde also mit einer Antikörperbindung derselben Fluoreszenz angezeigt, wohingegen FMO-Kontrollen, keine Antikörperbindung und dadurch keine Fluoreszenz anzeigen und somit einer ungefärbten Kontrolle gleichzusetzen sind. Da in der Trypanblau-Färbung kaum tote Zellen nachzuweisen waren, ist auf einen Totfarbstoff verzichtet worden.

Die regulatorischen T-Zellen wurden ebenfalls in einem zweiten Schritt mit weiteren Antikörpern inkubiert. Hierzu zählten CD45RO (BV510), CD45RA (PECy7) und PD-1 (BV711), wobei auch hier zur Negativkontrolle einzelne Vertiefungen jeweils ohne PD-1 und ohne CD45RA/CD45RO inkubiert wurden. Auch nach diesem zweiten Färbeschritt wurden T-Effektorzellen und regulatorische T-Zellen unter Lichtabschluss für 20 Minuten inkubiert und anschließend mit 150 µL FACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss dieser dreiminütigen Zentrifugierung und Dekantierung konnten die Zellen, die zur Färbung der T-Effektorzellen bestimmt waren, in 120 µL FACS-Puffer überführt werden und für die Untersuchung mittels Durchflusszytometrie verwendet werden. Die Zellen zur Färbung der Tregs unterzogen sich in weiteren Schritten einer im Folgenden beschriebenen intrazellulären Färbung.

T-Effektorzellen			
	1	2	3
1. Färbung	CLA PE		
	CD4 PerCP-Cy5.5		
	CD3 BV650		
	CD25 BV421		
2. Färbung	CCR4 PEcy7	mSlgG PEcy7	CCR4 PEcy7
	CXCR3 FITC	mSlgG1 FITC	CXCR3 FITC
	CCR6 BV510	mSlgG2b BV510	CCR6 BV510
	CCR10 APC	ham IgG APC	CCR10 APC
	CD45RO APC Cy7	CD45RO APC Cy7	x
	CD45RA BV711	CD45RA BV711	x

a)

b)					
Regulatorische T-Zellen					
Oberfläche	1	2	3	4	5
1. Färbung	CLA APC		x	CLA APC	x
	CD4 PerCP-Cy5.5				
	CD3 BV650				
	CD25 BV421				
	CD127 eFluor 780				x
Oberfläche					
2. Färbung	CD45RA PE Cy7				Puffer
	CD45RO BV510				
	PD-1 BV711			x	
	x	x		x	
	x	x	x	x	
	x	x	x	x	
Intrazellulär					
3. Färbung	rat IgG2a PE	Foxp3 PE	Foxp3 PE	CTLA-4 FITC	PermP
	x	CTLA-4 FITC	x	x	

Tabelle 4

Tabellarische Darstellung der Färbung auf einer Mikrotiterplatte mit drei Nöpfchen für die Färbung der T-Effektorzellen (a) und fünf für die der regulatorischen T-Zellen (b). Dabei werden beide in den ersten beiden Färbeschritten extrazellulär gefärbt. Die letzte und dritte Färbung ist intrazellulär und betrifft nur die Färbung der regulatorischen T-Zellen.

#### **4.4.3 Intrazelluläre Färbung**

Zur weiteren Differenzierung der Tregs wurden die bereits angefärbten Zellen zunächst mit 150 µl einer Fixierlösung 30 Minuten lang unter Lichtabschluss bei 4 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4 °C, 5 min, 350 g, mit Bremse) wurden je 150 µl des Permeabilisierungspuffers (PermP) beigemischt, um die Membrandurchlässigkeit der Zellen für die späteren Antikörper zu gewährleisten. Ohne diesen inkubieren zu lassen, wurde die Zellsuspension zentrifugiert (4 °C, 5 min, 350 g, mit Bremse) und dekantiert, sodass schließlich die eigentliche Färbung der intrazellulären Moleküle Foxp3 (PE) und CTLA-4 (FITC) mit FMO und Isotypkontrollen stattfinden konnte. Hierfür wurden von der Antikörperlösung jeweils 20 µl pro Vertiefung hinzugegeben und bei 4 °C unter Lichtabschluss 30 Minuten lang inkubiert. In einem letzten Schritt wurden schließlich weitere 150 µl des Permeabilisierungspuffers auf die Zellen gegeben, diese zentrifugiert (4 °C, 5 min, 350 g, mit Bremse), dekantiert und die so gereinigten Zellen mit 120 µl FACS-Puffer in ein FACS-Röhrchen überführt.

#### **4.5 Durchflusszytometrie**

Die zur Färbung verwendeten Antikörper sind alle mit einem Fluorochrom konjugiert, sodass die Zellen mit Hilfe der Immunfloreszenz untersucht werden können. Die Durchflusszytometrie (*FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting*) ermöglicht es, die Zellen so anhand ihrer Oberflächenmoleküle, aber auch anhand gebundener intrazellulärer Moleküle genau zu unterscheiden und zu identifizieren. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen wie in einer Perlenkette nacheinander durch eine Kapillare geleitet und durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt. Dabei wird das Licht gestreut und in verschiedene Richtungen abgelenkt. Nach vorne abgelenkte Strahlen, auch Vorwärtsstreulicht genannt (FSC, Forward Scatter), sind ein Maß für die Zellgröße, das im rechten Winkel gebrochene Licht hingegen, auch Seitwärtsstreulicht genannt (SSC, Side Scatter), ein Maß für die Granularität der Zellen. Gleichzeitig können die Fluoreszenzfarbstoffe durch einen monochromatischen Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Fallen sie im Anschluss wieder auf ihr Normalniveau herab, emittieren sie dabei Licht in einer für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge, welches dann durch spezielle Detektoren aufgefangen werden kann. Je mehr Fluorochrom-Moleküle also Bindungen auf der Zelle vorhanden sind, desto stärker letztlich das Signal. Die Fluoreszenzintensität ist also positiv

korreliert mit der Höhe der Molekülexpression auf der Zelle. Da jeder Fluoreszenzfarbstoff sein eigenes Emissionsspektrum besitzt, ist eine Färbung durch mehrere Farbstoffe und Anregung mit mehreren Lasern möglich. Überlappungen der Emissionsspektren konnten verhindert werden, indem alle Farbstoffe gegeneinander kompensiert und unterschiedliche Laser verwendet wurden. Die detektierten Lichtimpulse konnten mit einem Datenbearbeitungsprogramm (Diva 6.0, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet werden und so jede Zelle in einem Punktdiagramm dargestellt werden. Zur Analyse wurde ein BD LSRII Zytometer mit Rot-Blau-Violet (RBV)-Laser-Konfiguration und 12 Detektoren verwendet.

#### **4.5.1 T-Effektorzellen**

Durch die Größe und Granularität der Zellen konnte in der SSC-FFC-Darstellung abgegrenzt werden, bei welchen Zellen es sich prinzipiell um Lymphozyten handeln könnte. Um den Zellverlust durch Waschen zu kompensieren, wurde die Zellpopulation großzügiger eingegrenzt (Abbildung 6). Innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde dann eine Population eingegrenzt, die keine High-Expression von CD25 aufweisen, um Tregs auszuschließen. Diese wurde wiederum in einem nächsten Schritt in CXCR3<sup>+</sup> und CXCR3<sup>-</sup> Zellen unterteilt. Denn nur durch diese Abgrenzung war eine genaue Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen möglich. T<sub>h</sub>1-Zellen beispielsweise exprimieren CXCR3, nicht jedoch die Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR6. So konnten innerhalb der CXCR3<sup>+</sup> Population CCR4<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup> T<sub>h</sub>1-Zellen differenziert werden. Schaut man sich die Zellen an, die kein CXCR3 exprimieren, können ebenfalls mit Hilfe der oben genannten Chemokinrezeptoren T<sub>h</sub>2- und T<sub>h</sub>17-Zellen charakterisiert werden. Während T<sub>h</sub>17-Zellen beide Chemokinrezeptoren in hohem Maße exprimieren, exprimieren T<sub>h</sub>2-Zellen zwar CCR4, nicht jedoch CCR6.

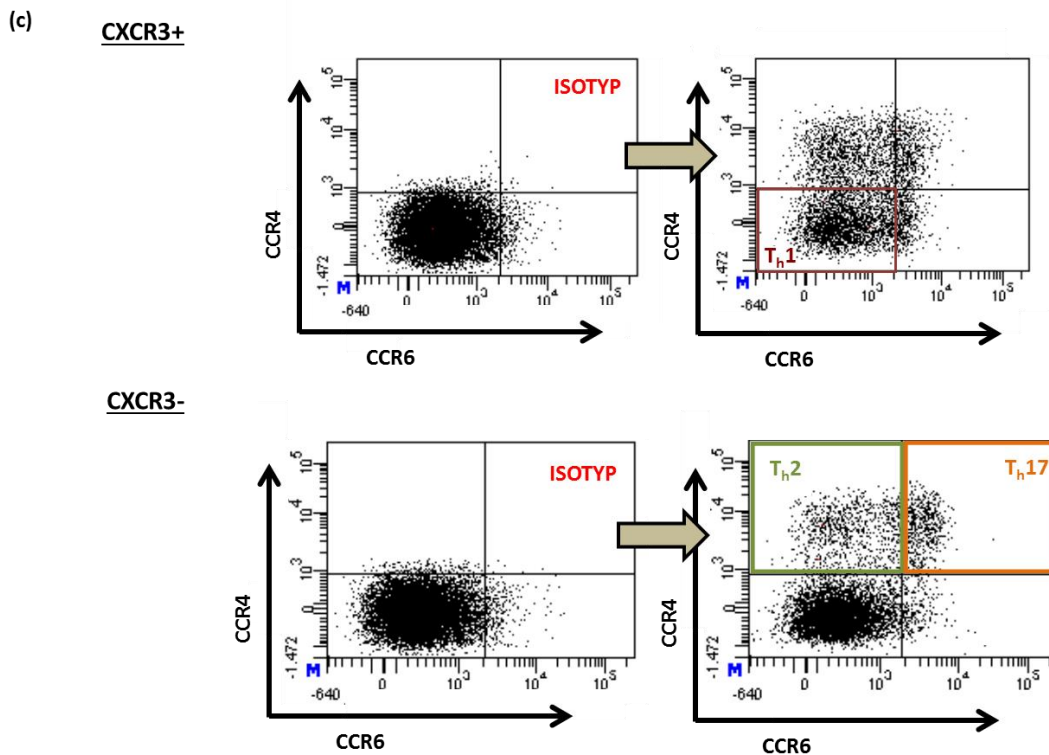
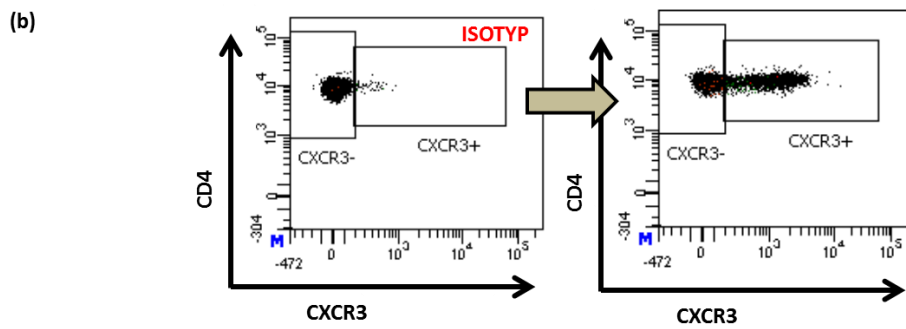
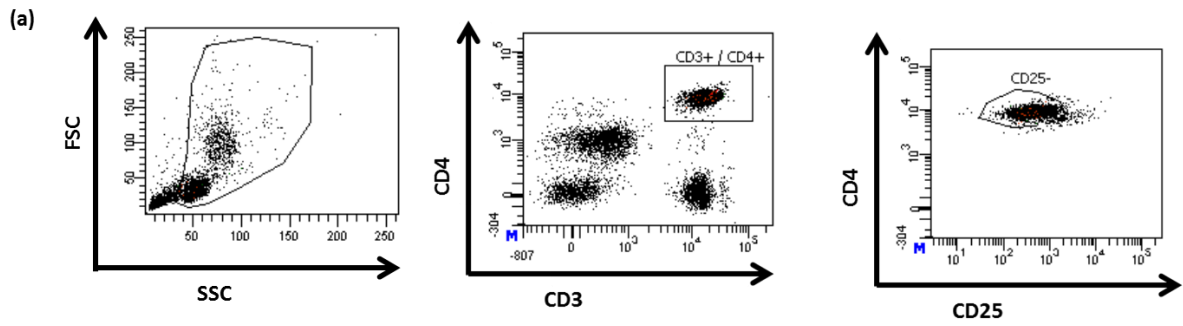


Abbildung 6: T-Effektorzellen

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen (ohne CD25 High Expression)(a), lassen sich in CXCR3<sup>+</sup> und CXCR3<sup>-</sup> Zellen unterteilen (b). Innerhalb der CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich so CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> T<sub>h</sub>1-Zellen differenzieren, in der CXCR3<sup>-</sup> Population CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> T<sub>h</sub>2-Zellen und CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> T<sub>h</sub>17-Zellen (c).

Innerhalb der CXCR3<sup>-</sup> Zellen sollten CCR4<sup>+</sup>CCR10<sup>+</sup> T<sub>h</sub>22-Zellen dargestellt werden. Wie in Abbildung 7 sichtbar ist, konnten jedoch nur vereinzelt Zellen dargestellt werden, sodass eine weitere Untersuchung der T<sub>h</sub>22-Zellen nicht möglich war und die Expression von CD45RO/RA und CLA nicht mehr beurteilt wurde.

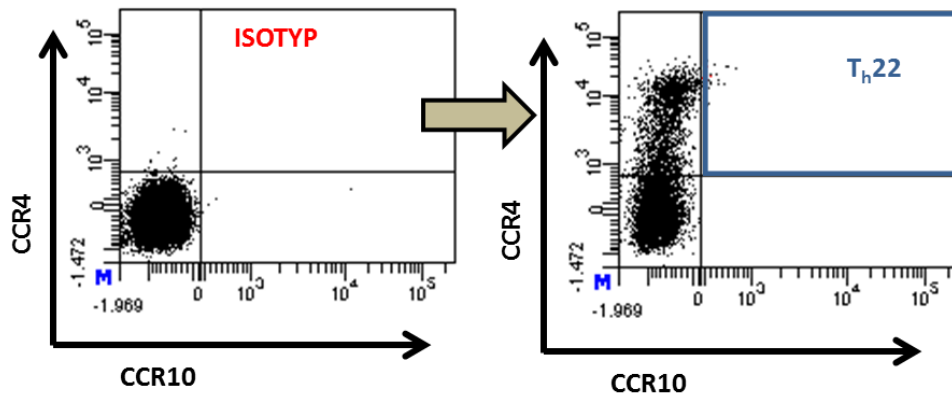


Abbildung 7: T<sub>h</sub>22-Zellen

Charakterisierung von CXCR3<sup>-</sup>CCR10<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>22-Zellen. Wie auf der Abbildung zu sehen ist, konnten keine T<sub>h</sub>22-Zellen eingegrenzt werden.

Bei den übrigen T-Zell-Subpopulationen wurde in einem weiteren Schritt die Expression von CD45RA und CD45RO untersucht, um einen Eindruck über den Aktivierungszustand dieser Zellen zu gelangen (Abbildung 8).

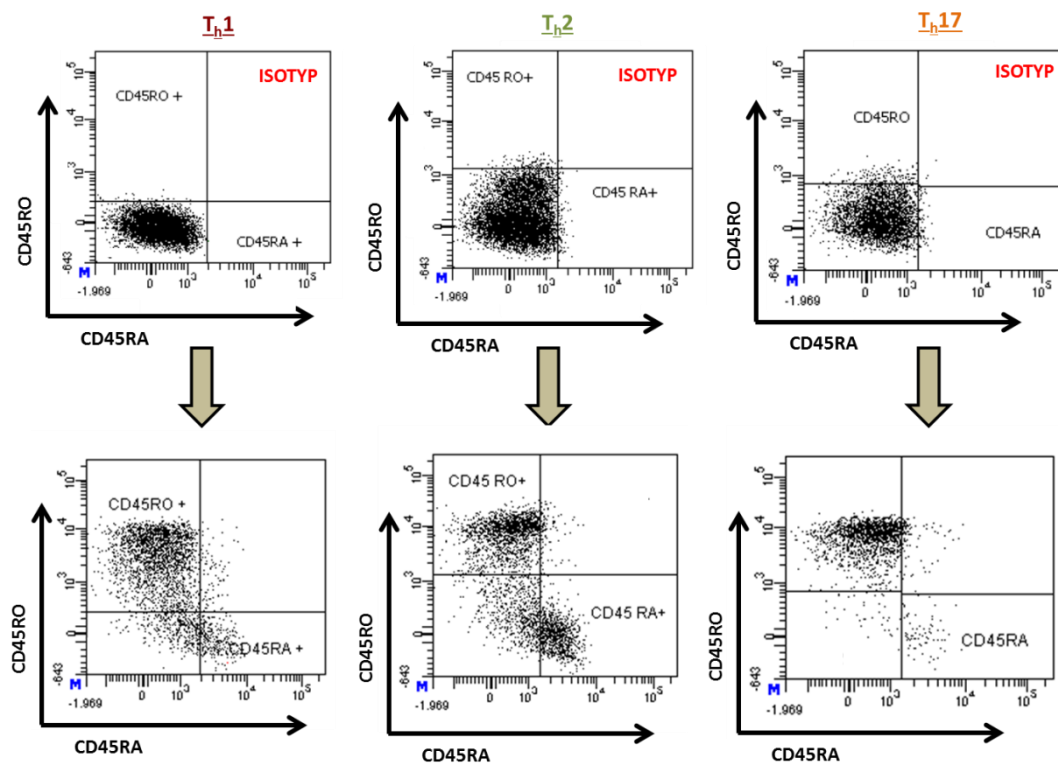


Abbildung 8: CD45RA/RO

Färbung von CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>1-, T<sub>h</sub>2- und T<sub>h</sub>17-Zellen



Schließlich wurde bei allen T-Effektorzellen auch die Expression des Skin-Homing-Rezeptors CLA untersucht (Abbildung 9).

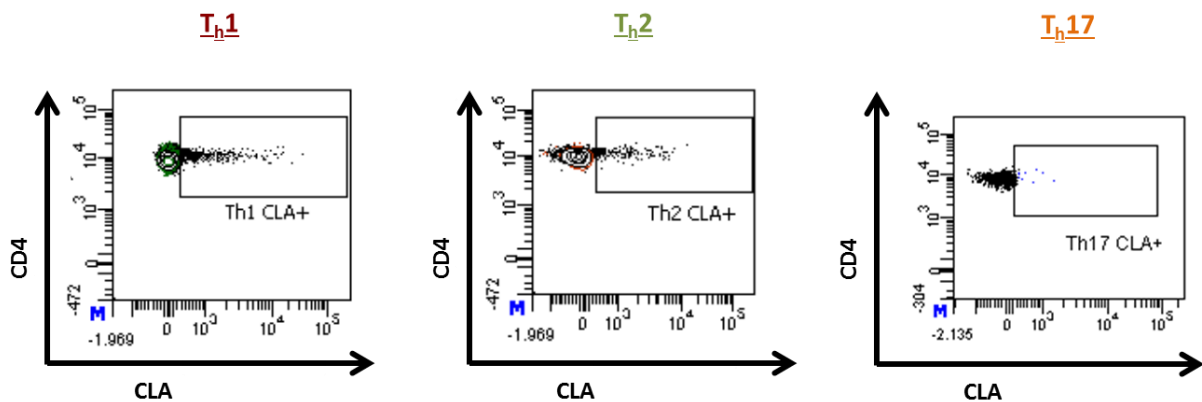


Abbildung 9: Expression des Skin-Homing-Rezeptors CLA  
CLA-Expression von  $T_{h1}$ ,  $T_{h2}$  und  $T_{h17}$  Zellen innerhalb der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen

#### 4.5.2 Regulatorische T-Zellen

Auch bei den regulatorischen T-Zellen wurden die Zellen zunächst in der SSC/FSC-Darstellung aufgetragen, wobei durch die Einwirkung des Permeabilisierungspuffers (Zytoplasma-Verlust, schrumpfen eine genaue Abgrenzung der Lymphozyten nicht möglich ist und aus diesem Grund alle Zellen eingegrenzt wurden (Abbildung 10a). Nachdem  $CD3^+CD4^+$  Zellen identifiziert wurden (Abbildung 10b), konnte innerhalb der  $CD25^{high}$  Zellen eine kleine Zellpopulation abgegrenzt werden, die vermehrt CD25 exprimieren und geringfügig weniger CD4 exprimieren (Abbildung 10c). Zur besseren Charakterisierung der Tregs wurde innerhalb dieser Population noch zwischen Zellen mit niedriger geringer und hoher CD127-Expression unterschieden (Abbildung 10d). Innerhalb der  $CD127^{low}$  Zellen wurden schließlich all jene abgegrenzt, die den intrazellulären Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimierten (Abbildung 10e). Die so differenzierten  $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}Foxp3^+$  Zellen charakterisieren demnach die regulatorischen T-Zellen.

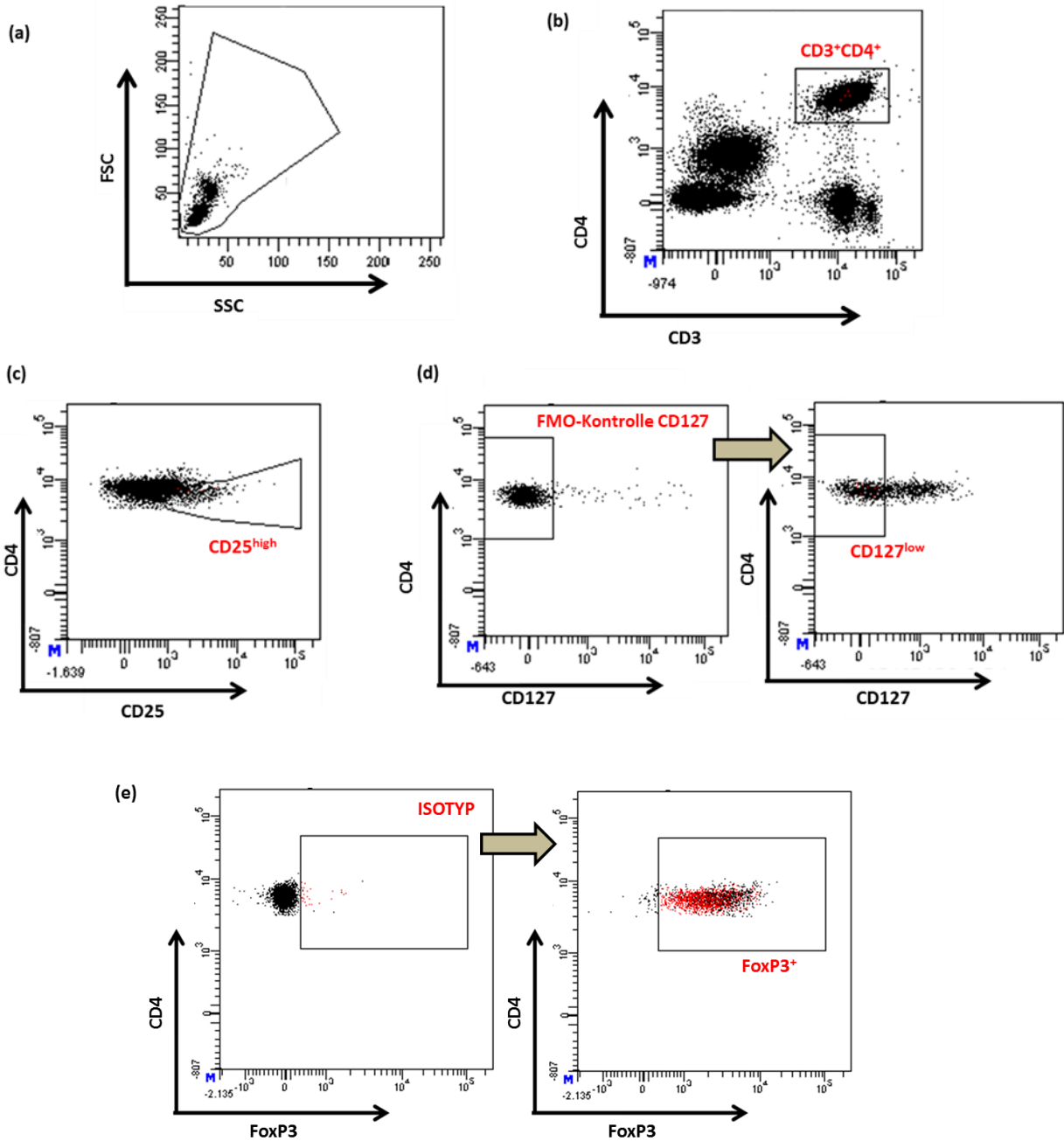


Abbildung 10: Eingrenzungsstrategie der regulatorischen T-Zellen

Innerhalb der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen (b) ließen sich Zellen mit einer hohen CD25-Expression abgrenzen (c). Auch diese Population ließ sich durch eine geringe CD127-Expression (d) genauer identifizieren. Schließlich konnten dann mit Nachweis vom Transkriptionsfaktor Foxp3 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs charakterisieren (e).

Wie bei den T-Effektorzellen wurde auch bei den Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen die Expression von CLA und CD45RA/RO dargestellt (Abbildung 11).

### Innerhalb der FoxP3<sup>+</sup> Tregs

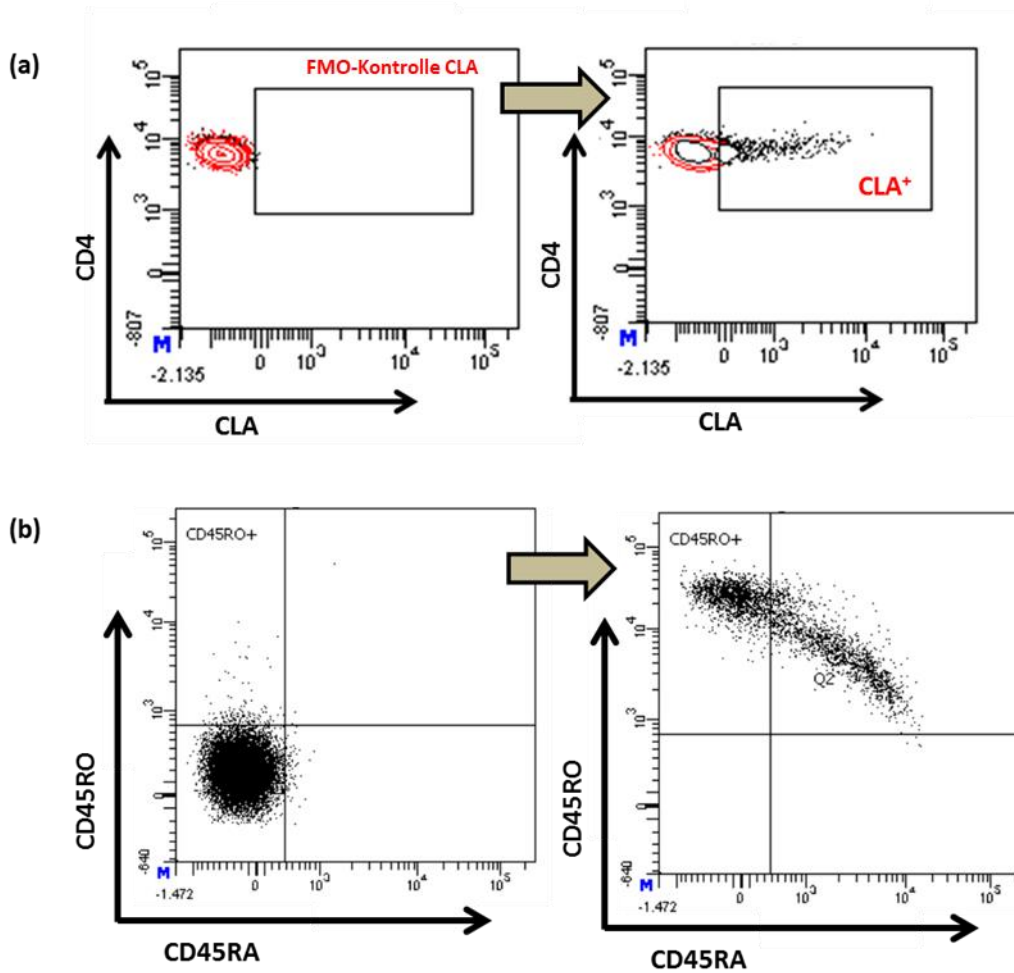
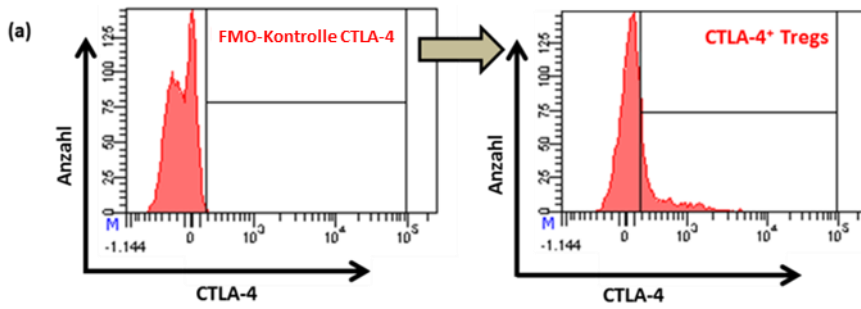


Abbildung 11: Weitere Differenzierung der Tregs  
Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen und ihre CLA-Expression (a) sowie die Expression von CD45RO/CD45RA (b)

In Abbildung 12 und 13 ist die Expression der immunregulierenden Proteine CTLA-4 und PD-1 zu sehen. Als Ausgangspopulation dienten zum einen Foxp3<sup>+</sup> Tregs, zur weiteren Spezifizierung auch CD45RO<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs. Aufgrund der geringen Zellzahl (<500) wurde hier die Darstellung im Histogramm gewählt.



*Innerhalb der CD45RO+ Zellen:*

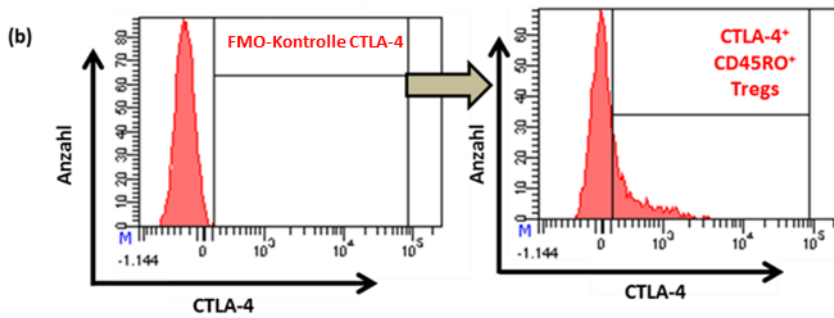
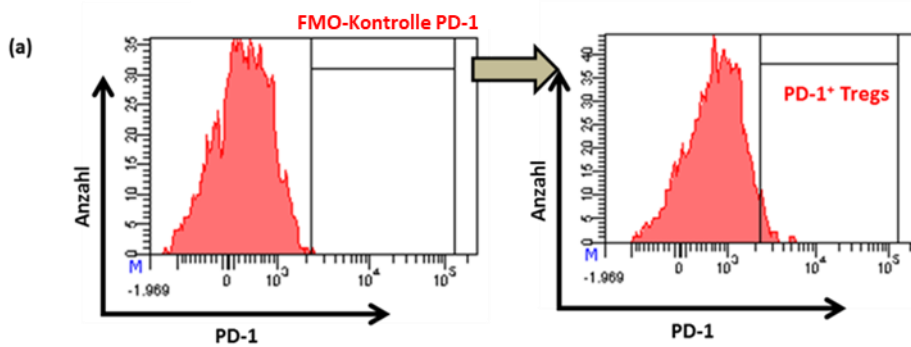


Abbildung 12: CTLA-4

Abgebildet sind die CTLA-4-Expression von Foxp3<sup>+</sup> Tregs (a), sowie von Tregs, die CD45RO<sup>+</sup> sind (b).



*Innerhalb der CD45RO+ Zellen:*

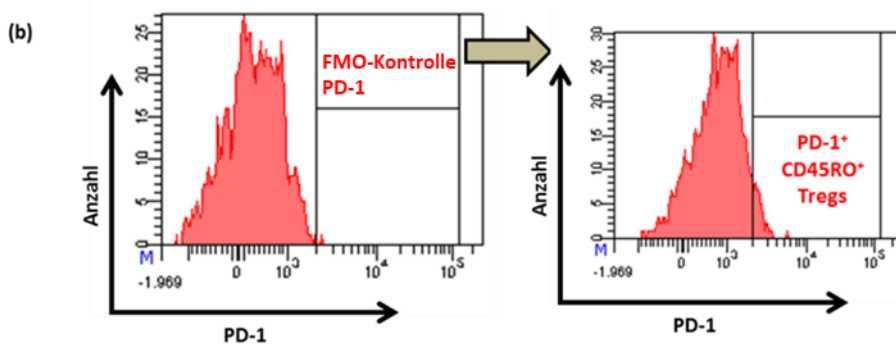


Abbildung 13: PD-1

Expression von PD-1 an Foxp3<sup>+</sup> Tregs (a) und CD45RO<sup>+</sup> Tregs (b).

## 4.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Alle statistischen Signifikanzen wurden mit dem student's t-test für paarige Stichproben berechnet. Neben dem Mittelwert zeigen die Graphen auch den berechneten Standardfehler, Korrelationskoeffizienten wurden nach Pearson berechnet. Die Werte werden, dann als signifikant angesehen, wenn  $p < 0,05$  ist (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,00005$ ). Für die Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient „r“ nach Pearson berechnet. Je näher dieser bei 1 bzw -1 liegt, desto stärker die Korrelation. Zusätzlich ist auch hier die statistische Signifikanz mit dem student's t-test berechnet worden.

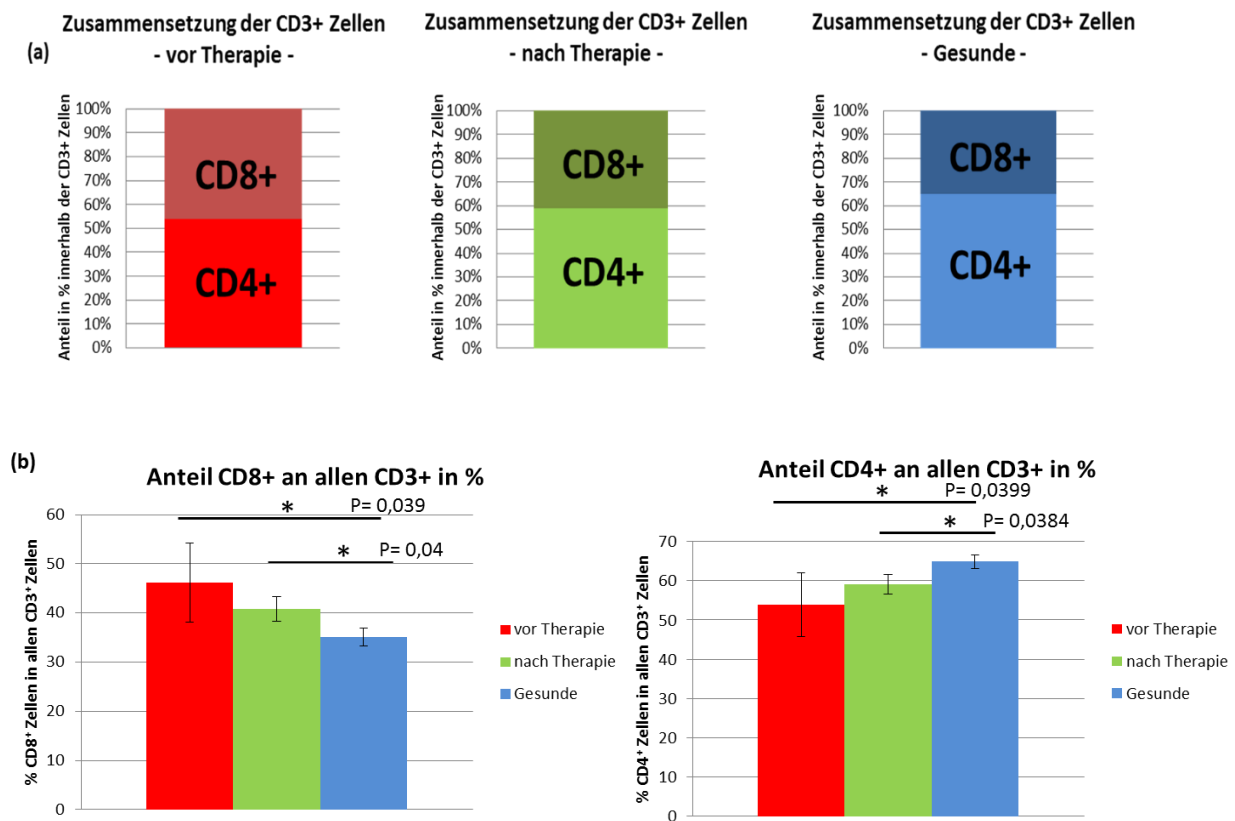
## 5 Ergebnisse

Zur besseren Übersicht sind die Werte der Psoriasis-Patienten vor der Therapie in rot und Werte drei Monate nach systemischer Therapie in grün dargestellt. Die Ergebnisse gesunder Patienten sind blau hinterlegt. Zur genaueren Betrachtung wurden die Ergebnisse in unterschiedlicher Weise dargestellt. Bei der Darstellung in Prozent ist der Bezugspunkt in der jeweiligen Grafik angegeben. Um die absolute Zellzahl zu ermitteln, wurde von der Gesamtzahl aller PBMCs in 80 mL Vollblut ausgegangen.

### 5.1 Zusammensetzung von PBMC und T-Zellen

#### 5.1.1 Zusammensetzung CD3<sup>+</sup> Zellen

Zunächst wurde bei allen Gruppen die Zusammensetzung der CD3<sup>+</sup> Zellen untersucht. Schaut man sich im Punktdiagramm alle CD3<sup>+</sup> Zellen an, so lassen sich zwei unterschiedliche Populationen differenzieren, wobei nur eine der beiden eine hohe Expression von CD4 aufweist (Abbildung 14). Während diese eindeutig als CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen charakterisiert wird, kann die jeweils andere Population also nur indirekt als CD8<sup>+</sup> beschrieben werden. Abbildung 14a gibt einen guten ersten Eindruck, wie alle CD3<sup>+</sup> Zellen zusammengesetzt sind. Erst der Vergleich dieser T-Zell-Populationen der einzelnen Gruppen zeigt jedoch die wesentlichen Unterschiede. So ist der Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen innerhalb aller CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei Gesunden mit im Schnitt 64% signifikant höher als bei Psoriasis-Patienten vor der Therapie mit einem Anteil von 53% ( $p=0,0399$ ). Ein merklicher Anstieg CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach der Therapie konnte nicht verzeichnet werden, auch ihr Anteil ist mit 59% niedriger als bei Gesunden ( $p=0,0384$ ). Mit dem Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen verhält es sich entsprechend antiproportional zum Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen.



**Abbildung 14: Zusammensetzung der CD3+ Zellen**

(a) Getrennte Darstellung der Zusammensetzung CD3+ Zellen für Psoriasis-Patienten vor und nach der Therapie, sowie für gesunde Probanden. (b) Direkter Vergleich aller drei Gruppen mit signifikant höherem Anteil CD4+ T-Zellen bei Gesunden gegenüber Psoriasis Patienten sowohl vor ( $p=0,0339$ ) als auch nach der Therapie ( $p=0,0384$ ).

Deutlichere Unterschiede lassen sich beobachten, wenn man den Anteil CD4+ T-Zellen an allen PBMCs misst (Abbildung 15). So ist der Unterschied zwischen Patienten vor der Therapie mit etwa 20% und gesunden Probanden mit 32% hoch signifikant ( $p=0,000036$ ). Auch steigt der Wert bei Psoriasis-Patienten nach der Therapie um etwa 6% ( $p=0,039$ ) und nähert sich dem Wert gesunder Probanden an, wenn auch noch ein signifikanter Unterschied zu den Gesunden zu sehen ist ( $p=0,01$ ). Diese Annäherung der Werte nach der Therapie an Werte gesunder Probanden wird bei der Betrachtung der absoluten Zellzahl CD4+ T-Zellen an allen PBMCs deutlicher. Hier besteht zwischen Gesunden und Patienten nach der Therapie kein signifikanter Unterschied mehr und liegen deutlich höher als die Werte der Patienten vor systemischer Therapie ( $p=0,021$  bzw.  $p=0,00009$ ).

### CD4+ Zellen innerhalb aller PBMC

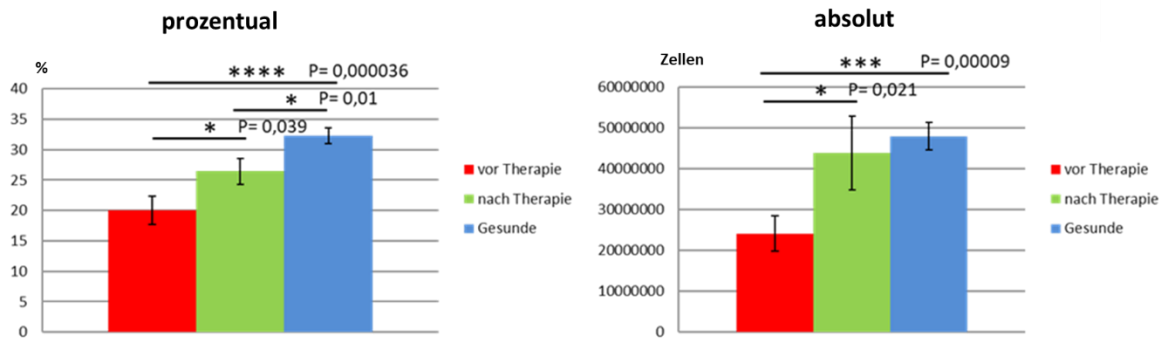


Abbildung 15: Anteil CD4+ Zellen

Prozentualer Anteil CD4+ T-Zellen an allen PBMCs und CD4+ Zellen in absoluten Zellzahlen. Gesunde zeigen dabei einen deutlich höheren Anteil CD4+ Zellen als Patienten vor der Therapie ( $p=0,000036$  für die prozentualen und  $p=0,00009$  für absoluten Werte). Des Weiteren lässt sich bei Psoriasis-Patienten ein signifikanter Anstieg durch die Therapie beobachten ( $p=0,039$  bzw.  $p=0,021$ ).

### 5.1.2 CLA+ Zellen

Interessanterweise exprimierten in der Gruppe der unbehandelten Psoriasis-Patienten 20-25% aller CD4+ T-Zellen den Skin-Homing-Rezeptor CLA, bei gesunden Probanden waren es mit knapp 5% deutlich weniger ( $p < 0,00005$ ). Fast ein Viertel aller Zellen scheinen also aufgrund der entzündeten Hautareale in Kontakt mit der Haut gekommen zu sein. Durch die Therapie sinkt dieser Anteil wieder deutlich auf Werte um die 7% ( $p < 0,00005$ ). Die absolute Zellzahl dieser CLA+CD4+ Zellen unterschied sich nicht. Dies mag jedoch auch daran liegen, dass Patienten nach der Therapie sowie gesunde Probanden generell mehr CD4+ T-Zellen besaßen als unbehandelte Patienten und so sich so die unterschiedlichen prozentualen Anteile wieder ausglich.

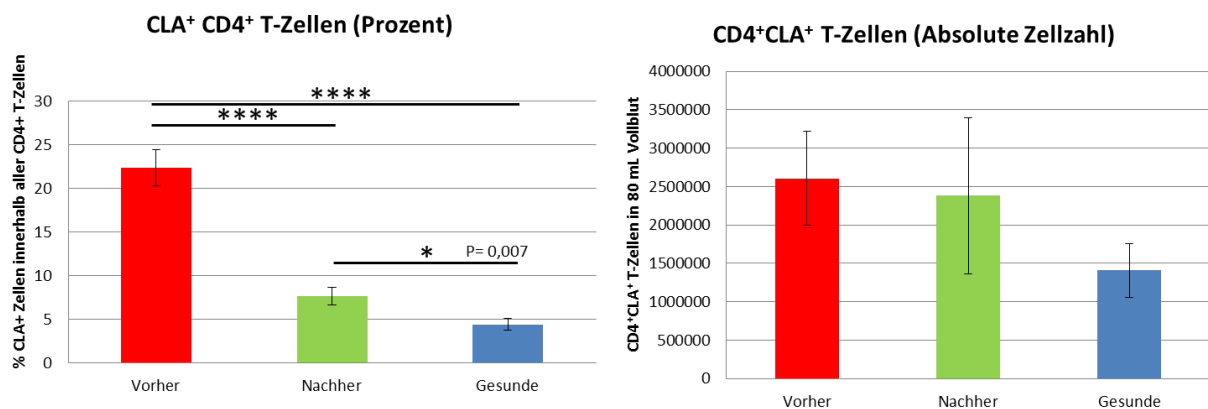


Abbildung 16: CLA+ CD4+ Zellen

CLA+ T-Zellen: Vorher  $n=19$ , Nachher  $n=12$ , Gesunde  $n=20$ . Links ist der prozentuale Anteil CLA+ Zellen innerhalb aller CD4+ T-Zellen dargestellt. Dabei wird deutlich, dass Gesunde und Patienten drei Monate nach systemischer Therapie deutlich weniger CLA+ exprimierende CD4+ T-Zellen besitzen ( $**** p < 0,00005$ ). Die absolute Zellzahl dieser Zellen unterschied sich nicht.



### 5.1.3 PASI-Korrelationen

Unter Einbeziehung des vor Therapiebeginn gemessenen PASI ist eine positive Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen an PBMC bzw. der absoluten Zellzahl CD4<sup>+</sup> Zellen bei Psoriasis-Patienten vor der Therapie und dem PASI erkennbar (Abbildung 17). Eine statistische Signifikanz dieser Korrelationen kann jedoch nur bei den absoluten Zellzahlen CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden ( $p=0,0007$ ). Mit Anstieg des PASI und damit Schwere der Ausprägung steigt also auch die absolute Zellzahl von CD4<sup>+</sup> Zellen, während die Zusammensetzung der PBMC und der prozentuale Anteil dieser Zellen unverändert bleibt.

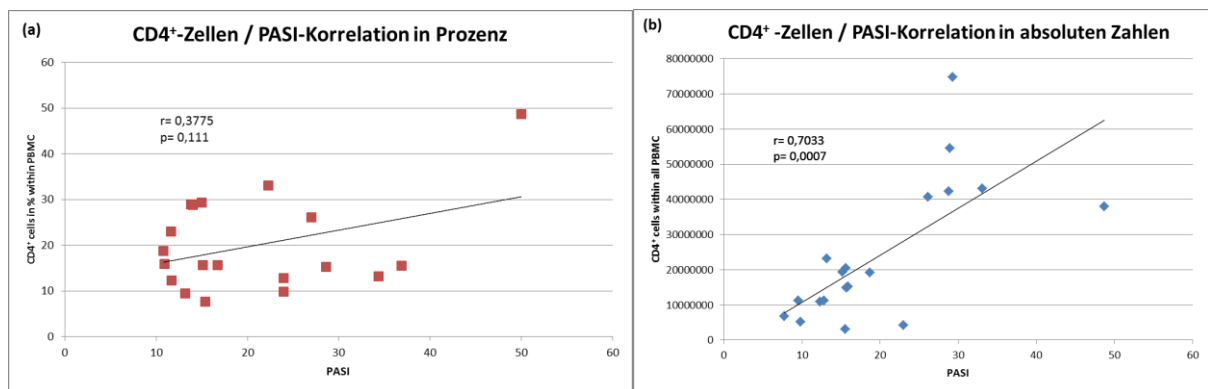


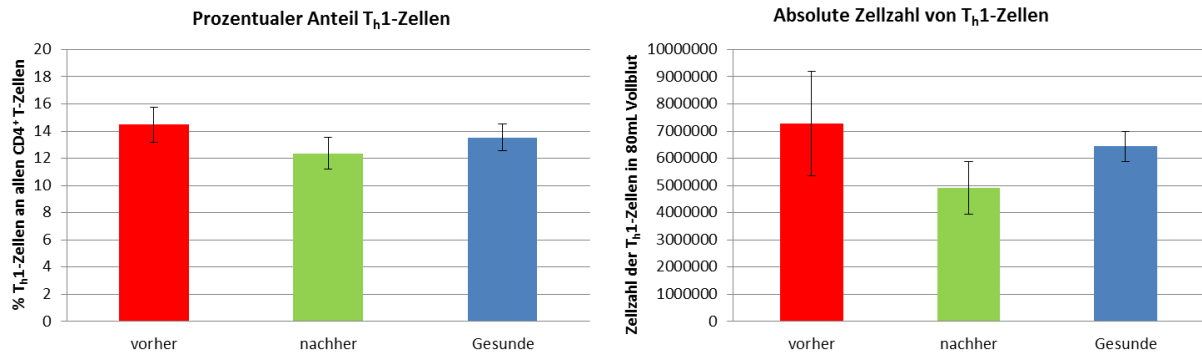
Abbildung 17: PASI-Korrelation

(a) Korrelation zwischen vor Therapie gemessenem PASI und dem prozentualen Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PBMC. Korrelationskoeffizient nach Pearson  $r=0,3775$ ,  $p=0,111$ ,  $n=19$ . (b) Sehr signifikante positive Korrelation zwischen vor Therapie gemessenem PASI und der absoluten Zellzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen aller gezählten PBMC in 80mL Vollblut. Korrelationskoeffizient nach Pearson  $r=0,7033$ ,  $p=0,0007$ ,  $n=19$

## 5.2 Subpopulationen der T-Zellen

### 5.2.1 T-Effektorzellen und regulatorische T-Zellen

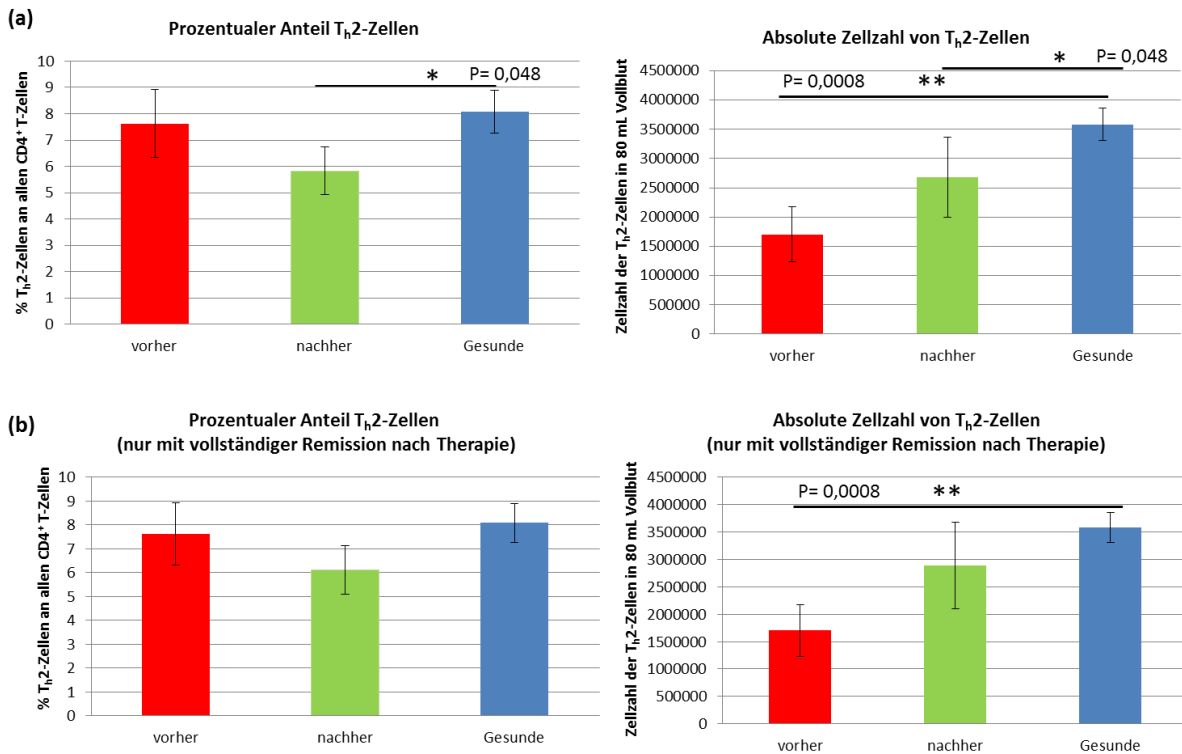
Vergleicht man die verschiedenen Subpopulationen der einzelnen Gruppen miteinander, so konnte bei den Th1-Zellen (definiert als CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR4<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>) weder ein Unterschied zwischen Patienten und Gesunden noch eine merkliche Veränderung durch die Therapie verzeichnet werden (Abbildung 18).



**Abbildung 18: T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen**

Vergleich aller T<sub>H</sub>1-Zellen: vorher n=19, nachher n=12, Gesunde n=20. Links ist der prozentuale Anteil der T<sub>H</sub>1-Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt, rechts die absolute Zellzahl, die in 80 mL entnommenem Vollblut enthalten sind. Es konnten weder Unterschiede zwischen Psoriasis-Patienten und Gesunden noch eine Veränderung durch die Therapie beobachtet werden.

Anders verhält sich dies bei zirkulierenden T<sub>H</sub>2-Zellen. Der prozentuale Anteil von T<sub>H</sub>2-Zellen (definiert als CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>) an allen CD4<sup>+</sup>Zellen ist bei Gesunden mit circa 8% signifikant höher als bei Patienten nach der Therapie (p= 0,048), unterscheidet sich aber nicht von Psoriasis-Patienten vor der Therapie (Abbildung 19). Betrachtet man jedoch die absolute Zellzahl von T<sub>H</sub>2-Zellen in 80 mL Vollblut, wird ein sehr signifikanter Unterschied zwischen nicht-therapierten Patienten und gesunden Probanden sichtbar (p= 0,0008). Während Gesunde also in absoluten Zahlen deutlich mehr T<sub>H</sub>2-Zellen besitzen als unbehandelte Patienten mit Psoriasis, ist die prozentuale Zusammensetzung CD4<sup>+</sup> T-Zellen und speziell der Anteil der T<sub>H</sub>2-Zellen zwischen diesen beiden Gruppen unverändert. In einem weiteren Schritt wurden in der Gruppe der Patienten nach der Therapie die drei Patienten ausgeschlossen, die keine vollständige Remission zeigten, die signifikanten Unterschiede zwischen dieser Gruppe und den gesunden Probanden entfielen dabei.

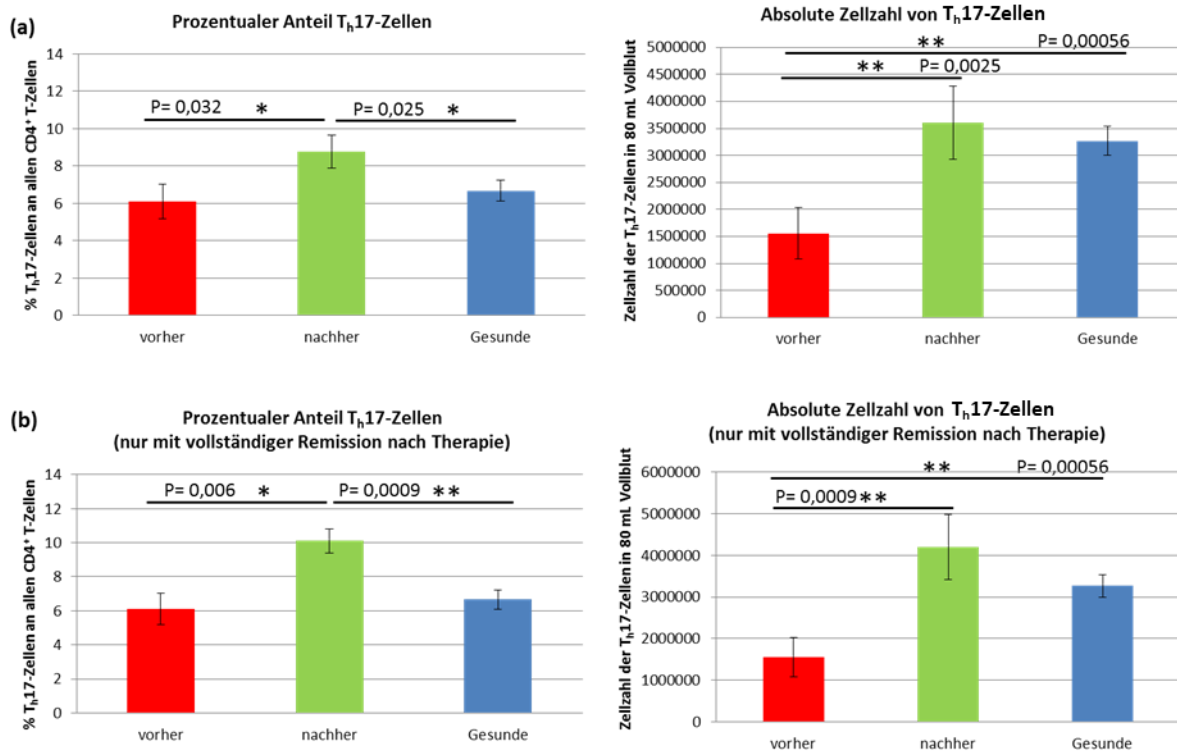


**Abbildung 19: T<sub>H</sub>2-Zellen**

Vergleich aller T<sub>H</sub>2-Zellen: vorher n=19, nachher n=12 in (a) und n=9 in (b), Gesunde n=20. In (a) ist links der prozentuale Anteil der T<sub>H</sub>2-Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, rechts die absolute Zellzahl in 80ml Vollblut dargestellt. Dabei zeigte sich in beiden Abbildungen ein signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe nach Therapie und Gesunden (beide p=0,048). Die prozentuale Zusammensetzung zwischen unbehandelten Patienten und Gesunden unterschied sich nicht, dafür besaßen gesunde Probanden in absoluten Zahlen signifikant mehr T<sub>H</sub>2-Zellen als Patienten vor der Therapie (p= 0,0008). (b) Der beschriebene Unterschied zwischen Patienten vor der Therapie und Gesunden entfällt, sobald die drei Patienten, die keine komplette Remission zeigten, aus den Berechnungen ausgeschlossen werden.

In Abbildung 20 ist die absolute Zellzahl von T<sub>H</sub>17-Zellen zu sehen (definiert als CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>). Sie konnte sich durch die systemische Therapie von circa 1,5 x 10<sup>6</sup> auf etwa 3,5 x 10<sup>6</sup> steigern (p=0,0025) und näherte sich dem Wert gesunder Probanden an, welche ebenfalls signifikant mehr T<sub>H</sub>17-Zellen besaßen als Psoriasis-Patienten (p= 0,00056). Diese Steigerung durch die systemische Therapie zeigte sich durch Ausschluss aller Patienten ohne vollständige Remission nach der Therapie sogar noch etwas stärker (p= 0,0009). Interessanterweise hatten gesunde Probanden zwar mehr T<sub>H</sub>17-Zellen in absoluten Zahlen, die prozentuale Zusammensetzung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bezüglich der T<sub>H</sub>17-Zellen unterschied sich hingegen kaum. Gesunde Menschen scheinen also insgesamt mehr T<sub>H</sub>17-Zellen im Blut zu haben, was jedoch nicht darüber hinwegtäuschen darf, dass ihr Anteil innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen unverändert bleibt. Signifikant erhöht hingegen war ihr Anteil aber bei erfolgreich therapierten Patienten mit vollständiger Remission, und zwar sowohl gegenüber den unbehandelten Psoriasis-Patienten (p= 0,006) und den gesunden Probanden

( $p=0,0009$ ). Eine systemische Therapie gegen Psoriasis vulgaris erhöht also den Anteil von  $T_H17$ -Zellen im Blut und ihre absolute Zellzahl.



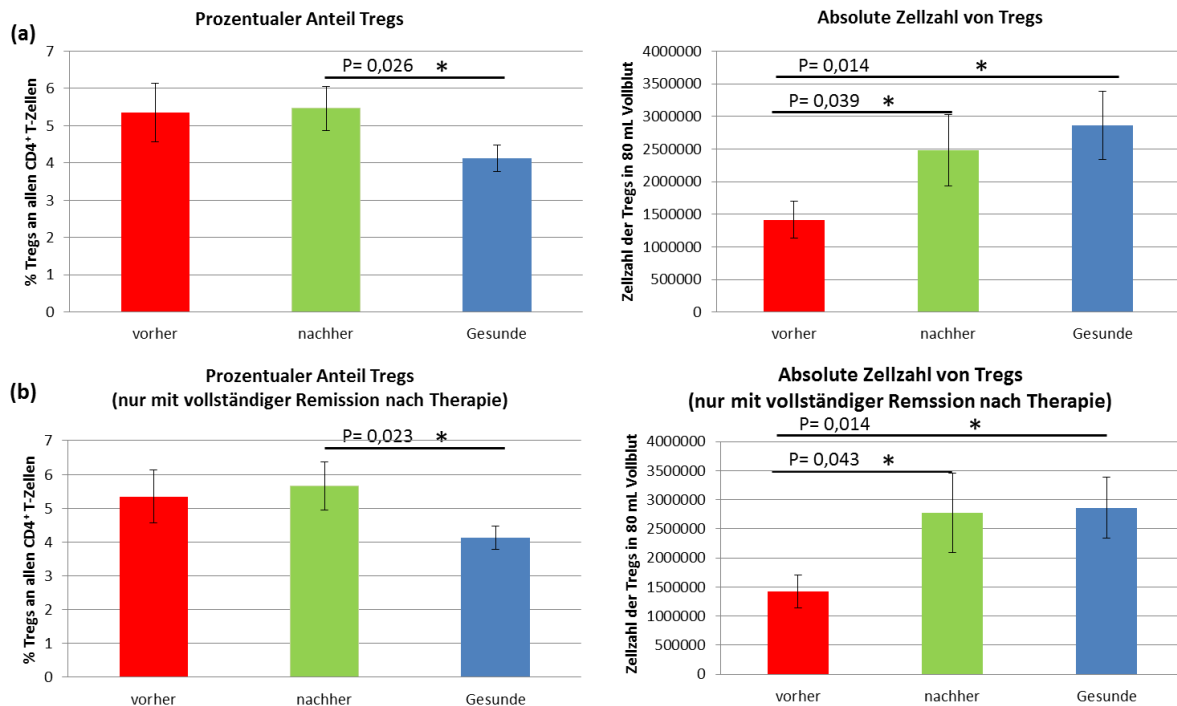
**Abbildung 20:  $T_H17$ -Zellen**

Vergleich aller  $T_H17$ -Zellen: vorher  $n=19$ , nachher  $n=12$  in (a) und  $n=10$  in (b). Betrachtet man die Ergebnisse in (b) unter Berücksichtigung einer vollständigen Remission nach systemischer Therapie, so wird eine deutliche Steigerung sowohl des prozentualen Anteils von  $T_H17$ -Zellen an allen  $CD4^+$  T-Zellen ( $p=0,006$ ) als auch der absoluten Zellzahl ( $p=0,0009$ ). Gesunde Probanden besitzen zwar eine deutlich höhere Anzahl an  $T_H17$ -Zellen als unbehandelte Psoriasis-Patienten ( $p=0,00056$ ), ihr prozentualer Anteil innerhalb aller  $CD4^+$  T-Zellen weist jedoch keinen merklichen Unterschied auf.

Die Zellzahl derer Zellen, die als  $CXCR3^+CCR4^+CCR10^+$   $T_H22$ -Zellen charakterisiert wurden, war zu gering um eine statistische Auswertung anfertigen zu können. Es konnten also weder im Blut von Psoriasis-Patienten noch von gesunden Probanden  $T_H22$ -Zellen nachgewiesen werden. Ob sie tatsächlich nicht vorhanden waren, oder diese Ergebnisse auf eine fehlerhafte Charakterisierung zurückzuführen sind, bleibt zu diskutieren.

Die absolute Zellzahl von regulatorischen T-Zellen verhält sich ähnlich wie die der  $T_H17$ -Zellen (Abbildung 22). Gesunde besitzen demnach in absoluten Zahlen nicht nur mehr  $T_H17$ -Zellen als Psoriasis-Patienten vor der Therapie, sondern auch signifikant mehr Tregs ( $p=0,014$ ). Die systemische Therapie erhöht zudem signifikant ebenfalls die Zellzahl ( $p=0,043$ ). Durch die systemische Behandlung der Psoriasis kann also die Zellzahl der Tregs wieder der von Gesunden angeglichen werden. Der prozentuale Anteil von Tregs an allen  $CD4^+$  T-Zellen

unterschied sich jedoch nicht zwischen Patienten und Gesunden. Dies wurde auch schon bei den  $T_H17$ -Zellen beobachtet. Trotz allem scheint die Therapie den prozentualen Anteil von regulatorischen T-Zellen etwas zu erhöhen, sodass er bei Patienten nach erfolgreicher Therapie signifikant höher ist als der Anteil bei gesunden Probanden ( $p=0,026$ ).



**Abbildung 22: Regulatorische T-Zellen**

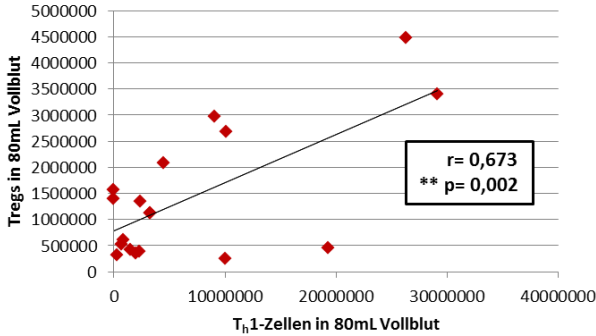
Vergleich aller Tregs: vorher  $n=19$ , nachher  $n=12$  in (a) und  $n=12$  in (b), Gesunde  $n=20$ . In (b) sind diejenigen Patienten, die nach der Therapie keine vollständige Remission zeigten, aus der Statistik ausgeschlossen worden. Ihre Ergebnisse ähnelten denen von (a). Psoriasis-Patienten besitzen signifikant weniger Tregs in absoluten Zahlen als Gesunde ( $p=0,014$ ), eine systemische Therapie erhöht diese Zellzahl wieder ( $p=0,043$ ). Der prozentuale Anteil der Tregs unterschied sich nicht zwischen Gesunden und noch nicht therapierten Patienten. Nach der Therapie zeigte sich jedoch ein signifikant erhöhter Anteil an Tregs gegenüber der Gruppe gesunder Probanden ( $p=0,023$ ).

## 5.2.2 Korrelation von T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen

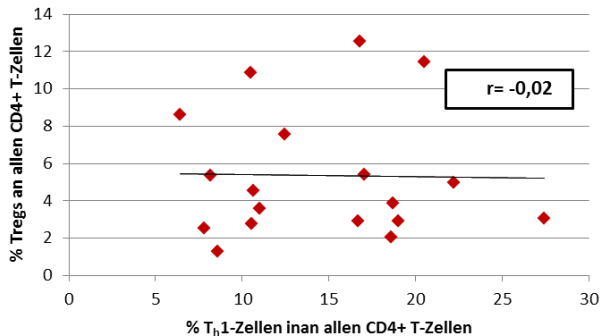
Um zu analysieren, ob in den einzelnen Gruppen die Anzahl bzw. der prozentuale Anteil von T-Effektorzellen mit denen der regulatorischen T-Zellen korrelieren, wurden in Abbildung 23 und 23 Korrelationen aufgezeichnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass Patienten vor der Therapie absolut mehr regulatorische Zellen besaßen, wenn es mehr  $T_H1$ -Zellen gab ( $p=0,002$ ). Der Korrelationskoeffizient liegt bei  $r=0,67$ , wobei ein  $r$ -Wert von 1 bzw -1 stärkere Korrelation angibt. Je näher der Wert bei Null liegt, desto schwächer die Korrelation. Dies konnte beispielsweise in der Analyse des prozentualen Anteils beobachtet

werden. Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,02 bei Patienten vor der Therapie konnte keine starke Korrelation beobachtet werden. Drei Monate nach systemischer Therapie ein ähnliches Ergebnis: Je mehr Tregs der Patient in absoluten Zahlen hatte, desto mehr  $T_h1$ -Zellen konnten nachgewiesen werden ( $r=0,702$ ;  $p= 0,011$ ). Auch hier wurde bei Betrachtung des prozentualen Anteils keine gute Korrelation beobachtet werden ( $r=0,292$ ). Bei Gesunden bestand in absoluten Zahlen keinerlei Korrelation, wohingegen der prozentuale Anteil von Tregs und  $T_h1$ -Zellen eine mäßige Korrelation aufwies.

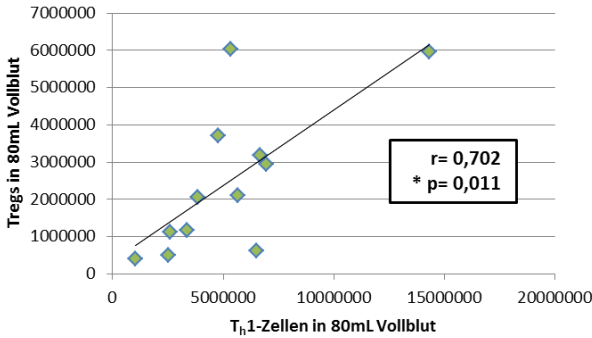
**(a)  $T_h1$ /Treg-Korrelation (absolute Zellzahl) - VORHER -**



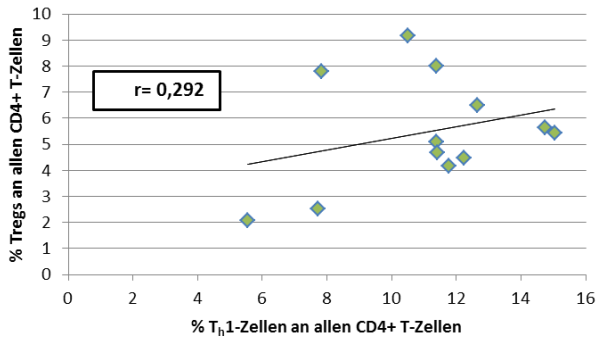
**$T_h1$ /Treg-Korrelation (Prozent) - VORHER -**



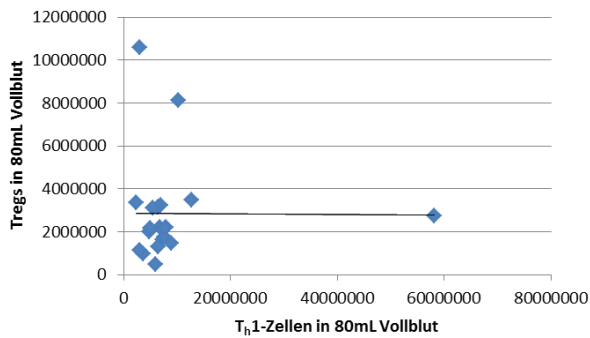
**(b)  $T_h1$ /Treg-Korrelation (absolute Zellzahl) - NACHHER -**



**$T_h1$ /Treg-Korrelation (Prozent) - NACHHER -**



(c)  $T_h1$ /Treg-Korrelation (absolute Zellzahl)  
- GESUNDE -



$T_h1$ /Treg-Korrelation (Prozent)  
- GESUNDE -

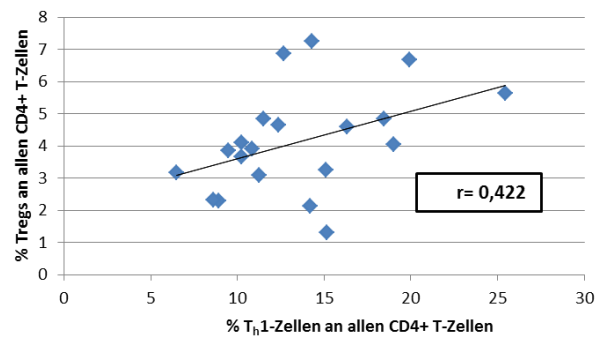
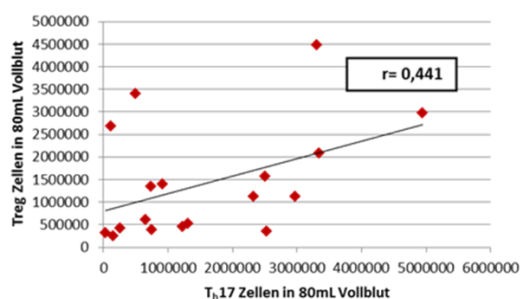


Abbildung 23 Korrelationen  $T_h1$ -Zellen zu regulatorischen T-Zellen

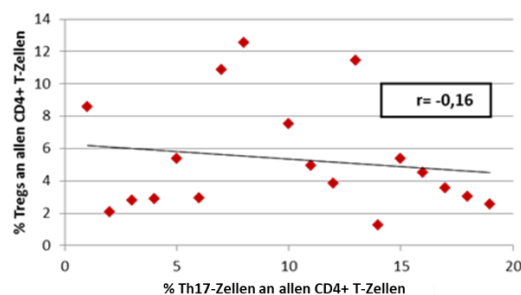
Korrelation zwischen  $T_h1$ -Zellen und Tregs in absoluten Zahlen (links) und Prozent (rechts). Vorher  $n=19$ , nachher  $n=12$ , Gesunde  $n=20$ . Korrelationskoeffizienten nach Pearson angegeben. Eine signifikante positive Korrelation konnte bei der absoluten Zellzahl in der Gruppe der Nicht-therapierten (a) ( $p=0,002$ ) und therapierten Patienten (b) ( $p=0,011$ ) gezeigt werden.

Eine signifikante Korrelation zwischen der absoluten Zellzahl regulatorischer T-Zellen und  $T_h17$ -Zellen konnte zwar bei Patienten nach der Therapie, nicht jedoch bei Patienten mit einer aktiven Psoriasis Erkrankung vor der Therapie beobachtet werden. Bei Betrachtung des prozentualen Anteils ergab sich weder bei unbehandelten noch bei behandelten Patienten eine Korrelation. Anders bei den gesunden Probanden: Hier konnte eine signifikante Korrelation des prozentualen Anteils von regulatorischer T-Zellen und  $T_h17$ -Zellen beobachtet werden, bei Betrachtung der absoluten Zellzahl wiederum nicht.

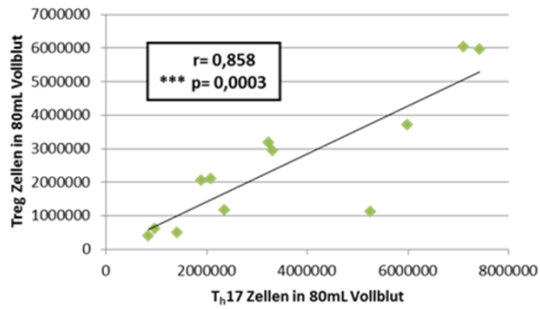
(a)  $T_h17$ /Treg-Korrelation (absolute Zellzahl)  
- VORHER -



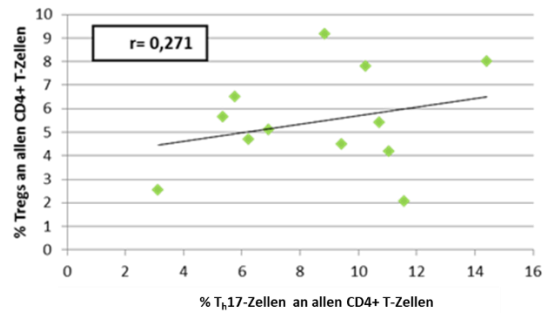
$T_h17$ /Treg-Korrelation (Prozent)  
- VORHER -



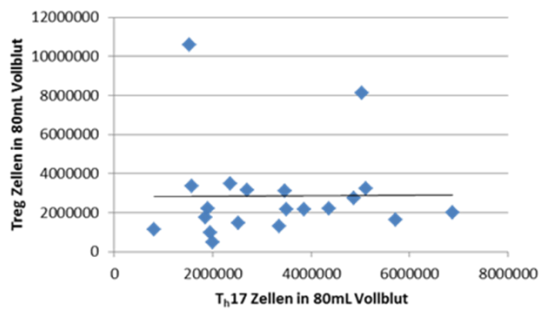
(b) T<sub>h</sub>17/Treg-Korrelation (absolute Zellzahl)  
- NACHHER -



T<sub>h</sub>17/Treg-Korrelation (Prozent)  
- NACHHER -



(c) T<sub>h</sub>17/Treg-Korrelation (absolute Zellzahl)  
- GESUNDE -



T<sub>h</sub>17/Treg-Korrelation (Prozent)  
- GESUNDE -

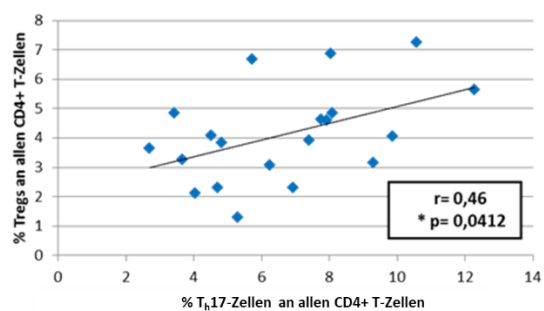


Abbildung 24: Korrelation T<sub>h</sub>17-Zellen zu regulatorischen T-Zellen

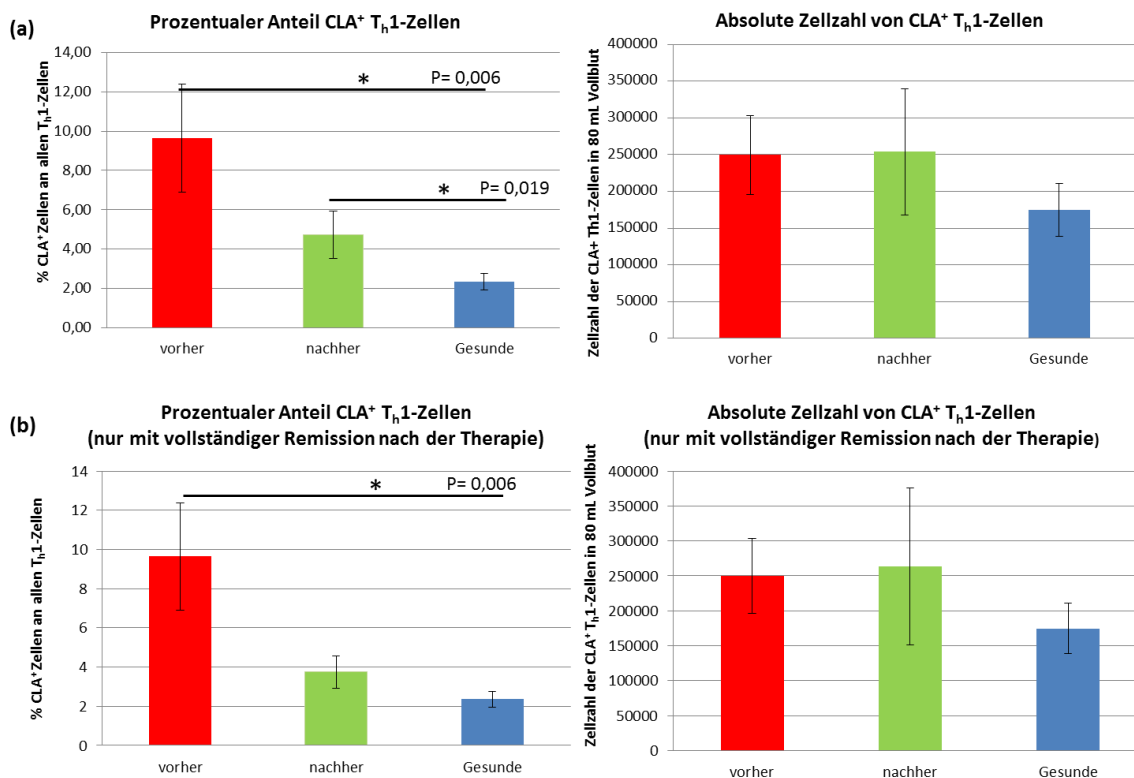
Korrelation zwischen T<sub>h</sub>17-Zellen und Tregs in absoluten Zahlen (links) und Prozent (rechts). Vorher n=19, nachher n=12, Gesunde n=20. Korrelationskoeffizienten nach Pearson angegeben. Eine signifikante positive Korrelation konnte bei der absoluten Zellzahl in der Gruppe der therapierten Patienten beobachtet werden (p= 0,0003). Ebenfalls stieg mit steigender absoluten Treg-Zellzahl auch die Zellzahl der T<sub>h</sub>17-Zellen (p= 0,041).

### 5.2.3 Vergleich von CLA<sup>+</sup> T-Effektorzellen

Als nächstes wurde untersucht, wie viele T-Effektorzellen den Skin-Homing-Rezeptor CLA exprimierten, um so Aufschluss darüber zu geben, welche der T-Zellen tatsächlich einen Bezug zur Haut hatten. Dabei fiel auf, dass die absolute Zellzahl dieser CLA<sup>+</sup> Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen aufwies. Während in Kapitel 6.2.1 gezeigt wurde, dass auch der prozentuale Anteil von T<sub>h</sub>1-Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine Unterschiede zeigte, konnte nun aber gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil von CLA<sup>+</sup> Zellen an allen gemessenen T<sub>h</sub>1-Zellen bei Psoriatikern vor der Therapie höher ist als bei gesunden Probanden (p= 0,006). Psoriasis-Patienten vor der Therapie besitzen also nicht unbedingt mehr T<sub>h</sub>1-Zellen als gesunde Probanden; die T<sub>h</sub>1-Zellen, die sie besitzen,



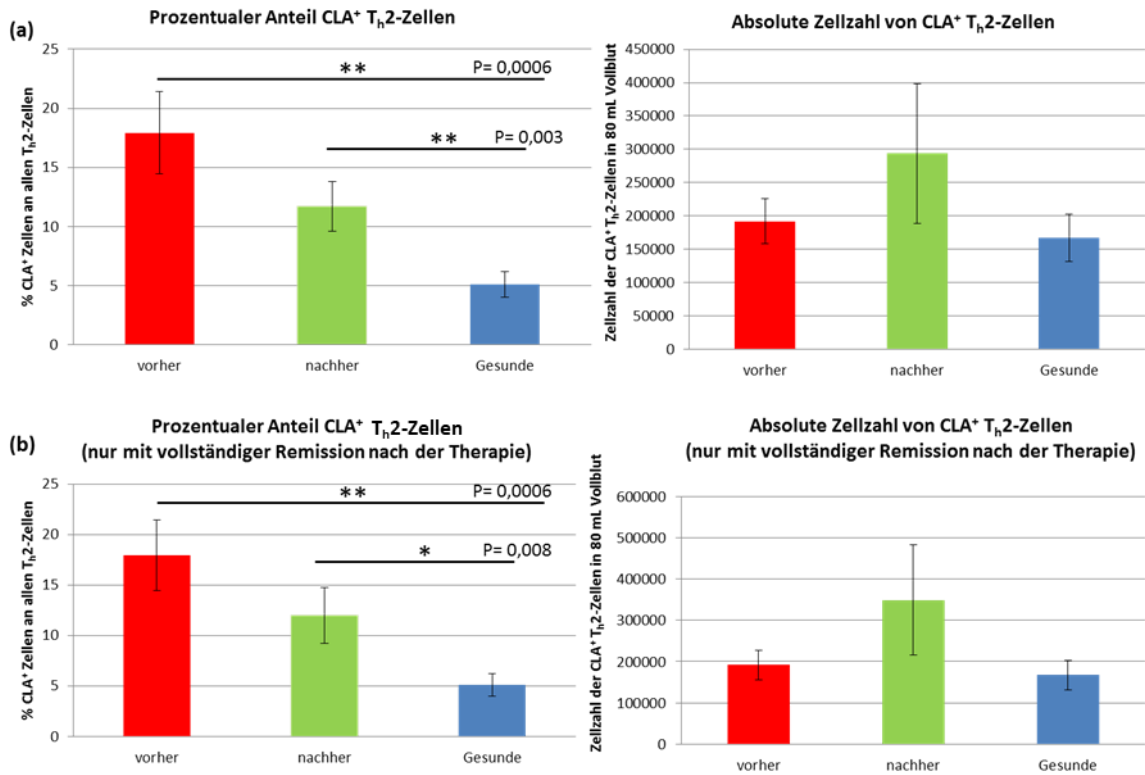
exprimieren aber mehr CLA. Daraus lässt sich schließen, dass durch die psoriatische Entzündung in der Haut mehr T<sub>H</sub>1-Zellen in die Haut migrieren (Abbildung 24).



**Abbildung 24: CLA<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen**

Vorher n=19, nachher n=12 in (a) und n=9 in (b), nachher n=20. Links ist der prozentuale Anteil von CLA<sup>+</sup> Zellen in Bezug zu allen T<sub>H</sub>1-Zellen. Schaut man sich in (b) die Ergebnisse an, bei denen alle Patienten aus der Statistik ausgeschlossen wurden, die nach der Therapie keine vollständige Remission zeigten, so bleibt der signifikante Unterschied zwischen dem Anteil von CLA<sup>+</sup> Zellen bei Gesunden und Erkrankten vor der Therapie (p=0,006).

Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei T<sub>H</sub>2-Zellen beobachtet werden (Abbildung 25). Die absolute Zellzahl von CLA<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen zeigte keine großen Unterschiede, jedoch exprimierten die vorhandenen T<sub>H</sub>2-Zellen von Psoriasis-Patienten sowohl vor als auch nach der Therapie signifikant mehr CLA als gesunde Probanden (p= 0,0006 und p=0,008). Gesunde Probanden scheinen also genau so viele CLA<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen zu haben wie betroffene Patienten, jedoch exprimieren von allen T<sub>H</sub>2-Zellen der Gesunden prozentual deutlich weniger Zellen CLA als die der Psoriasis-Patienten. Eine signifikante Reduktion durch die systemische Therapie konnte nicht beobachtet werden, wenn auch ein leichter Trend zu weniger CLA durch die Therapie zu verzeichnen ist.



**Abbildung 25: CLA<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen**

Vorher n=19, nachher n=12 in (a) und n=9 in (b), Gesunde n=20. Die absolute Zellzahl von CLA<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen bleibt durch die Therapie unverändert und unterscheidet sich auch nicht zur Zellzahl von gesunden Probanden. Allerdings ist der prozentuale Anteil CLA-exprimierender Zellen bei gesunden Probanden signifikant niedriger als bei Psoriasis-Patienten vor der Therapie (p=0,0006) und nach der Therapie (p=0,008).

Schließlich gilt selbiges auch für T<sub>H</sub>17-Zellen (Abbildung 26). Die absolute Zellzahl bleibt unverändert, von allen T<sub>H</sub>17-Zellen exprimieren bei Psoriasis-Patienten vor der Therapie signifikant mehr Zellen CLA als Zellen von gesunden Probanden (p=0,007). Es lässt sich also daraus schließen, dass der prozentuale Anteil von CLA-exprimierender Zellen bei allen T-Effektorzellen deutlich höher ist, wenn eine unbehandelte Psoriasis vorliegt

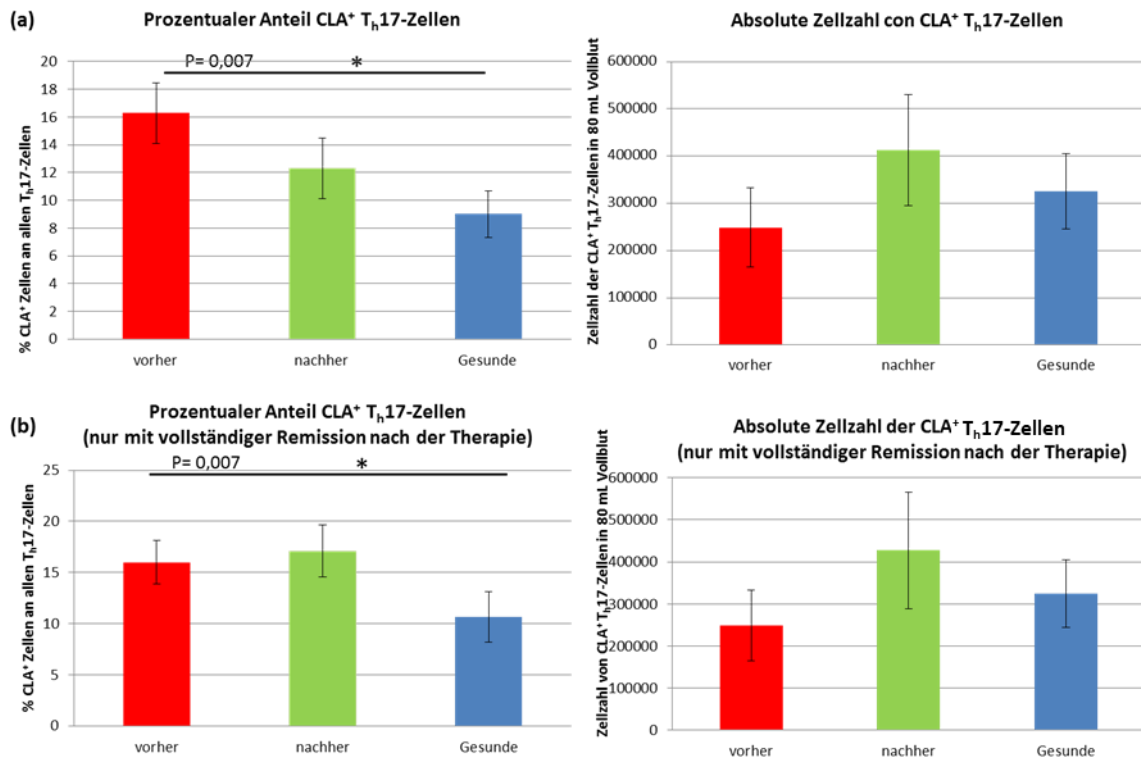
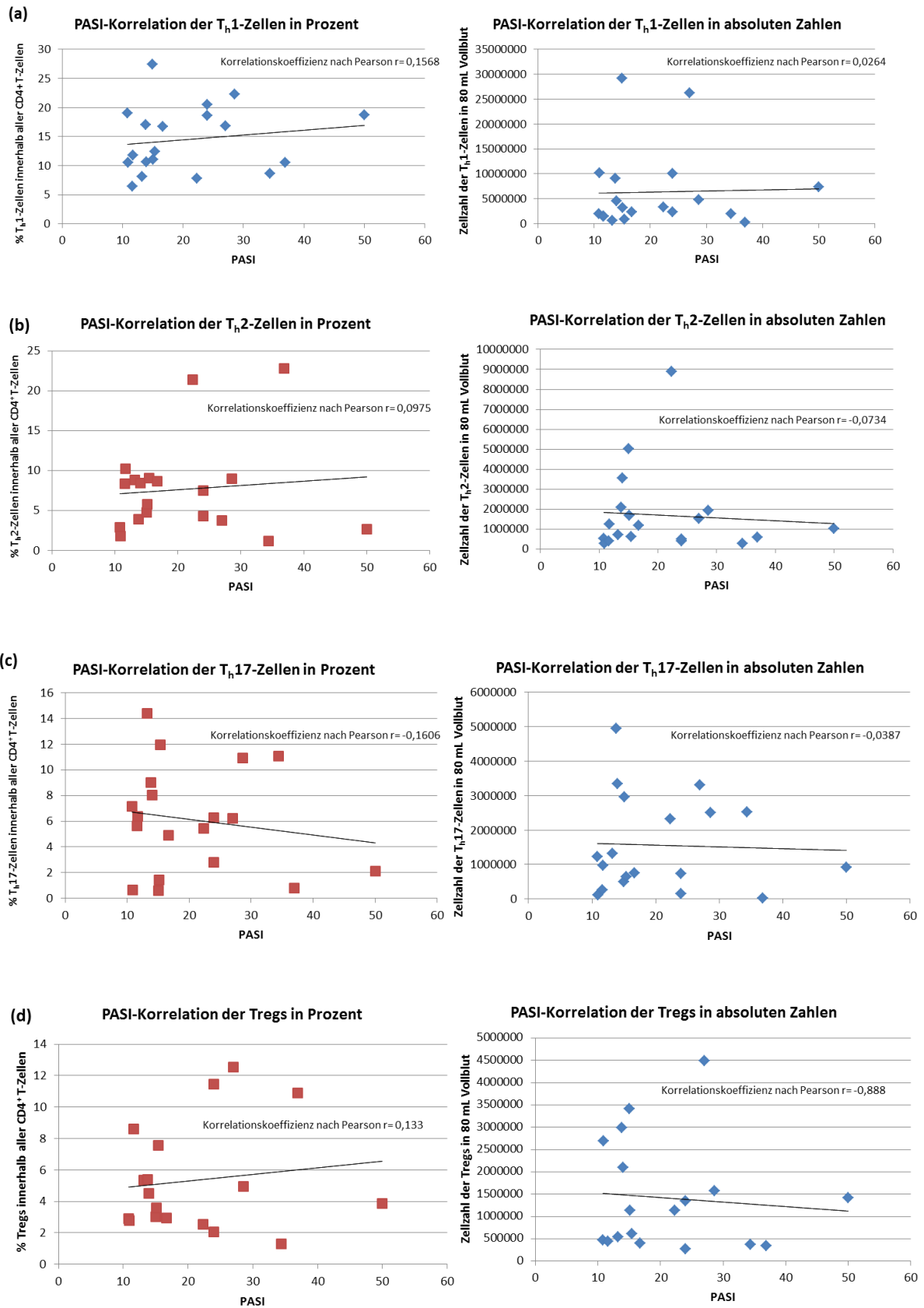


Abbildung 26: CLA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>17-Zellen

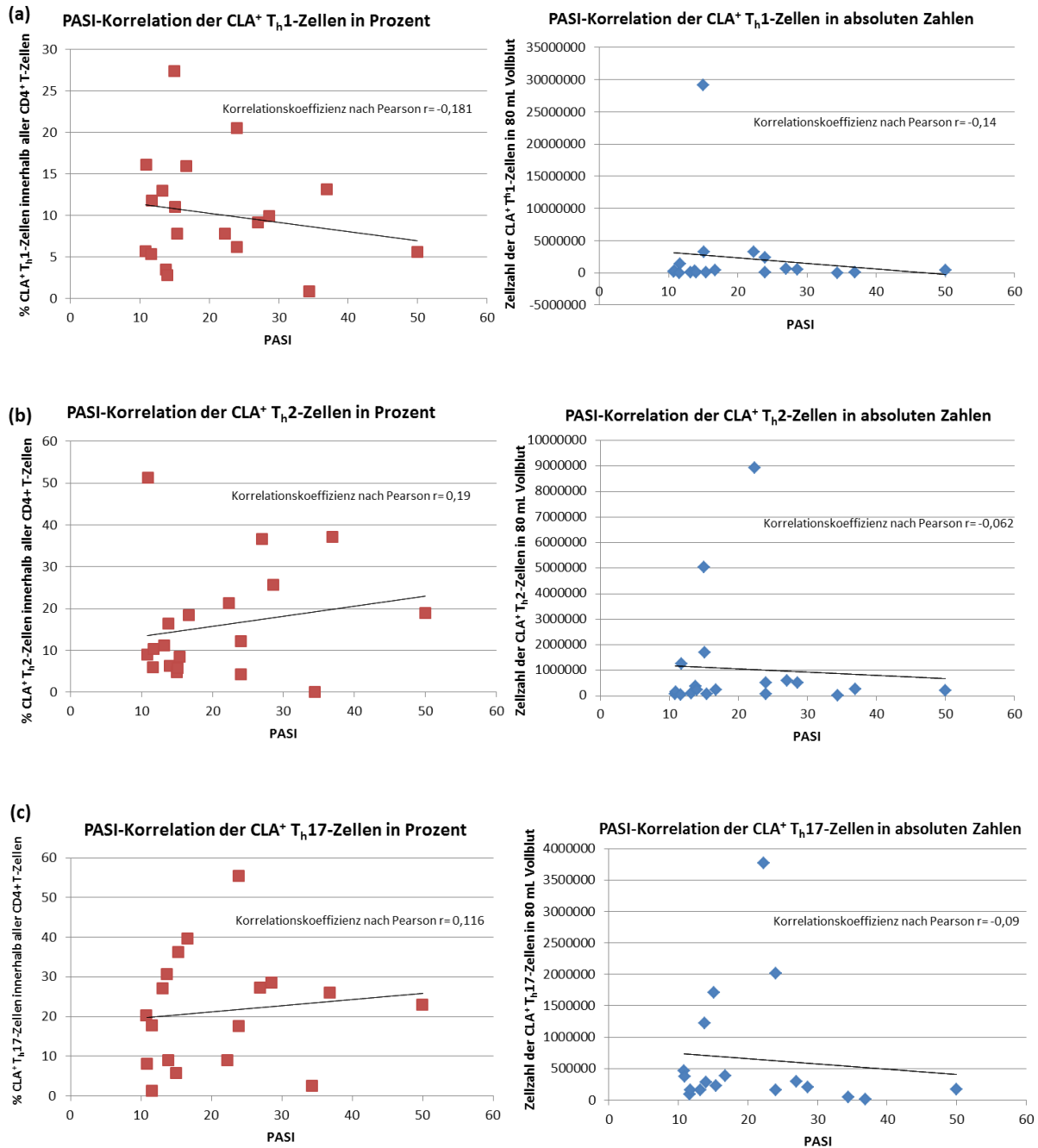
Vorher n=19, nachher n=12 in (a) und n=9 in (b), Gesunde n=20. In (b) wurden alle Patienten, die nach der Therapie keine vollständige Remission zeigten, von der Statistik ausgeschlossen. Während die absolute Zellzahl der CLA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>17-Zellen sich zwischen den Gruppen nicht unterschied (rechts), war der prozentuale Anteil von CLA<sup>+</sup> Zellen unter allen T<sub>h</sub>17-Zellen bei Patienten vor der Therapie signifikant höher als bei Gesunden (p=0,007).

## 5.2.4 PASI-Korrelationen

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob der prozentuale Anteil der T-Effektorzellen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und deren absolute Zellzahl bei Patienten vor Beginn der systemischen Therapie mit dem PASI korrelierten (Abbildung 27). Leider konnte dabei für keine der T-Effektorzellen eine signifikante Korrelation gezeigt werden. Mit steigendem PASI konnte also weder eine Reduktion oder Steigerung der T-Zell-Subpopulation beobachtet werden. Gleiches gilt auch für die CLA<sup>+</sup> T-Effektorzellen (Abbildung 28). Auch ihre Anzahl blieb durch einen steigenden PASI unbeeinflusst.



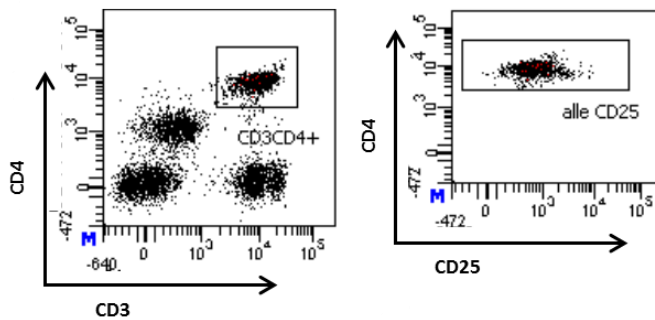
**Abbildung 27: PASI-Korrelation T-Effektorzellen**  
 Korrelationen von PASI und T-Zell-Subpopulation für T<sub>h</sub>1-Zellen (a), T<sub>h</sub>2-Zellen (b), T<sub>h</sub>17-Zellen (c) und regulatorische T-Zellen (d) in Prozent und in absoluten Zahlen. Dargestellt sind die Messwerte von Psoriasis-Patienten vor der systemischen Therapie, n=19. Eine signifikante Korrelation konnte bei keinen der Subpopulationen beobachtet werden.



**Abbildung 28: PASI-Korrelation CLA<sup>+</sup> T-Effektorzellen**  
 Korrelation von PASI und CLA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>1-Zellen (a), T<sub>h</sub>2-Zellen (b) und T<sub>h</sub>17-Zellen (c) von Patienten vor Beginn der systemischen Therapie. Links ist der prozentuale Anteil dieser Subpopulationen an allen CD4<sup>+</sup> Zellen, rechts die absolute Zellzahl in 80 mL Vollblut dargestellt. Eine signifikante Korrelation zum PASI konnte bei keiner der Subpopulationen nachgewiesen werden.

### 5.2.5 Aktive T-Effektorzellen

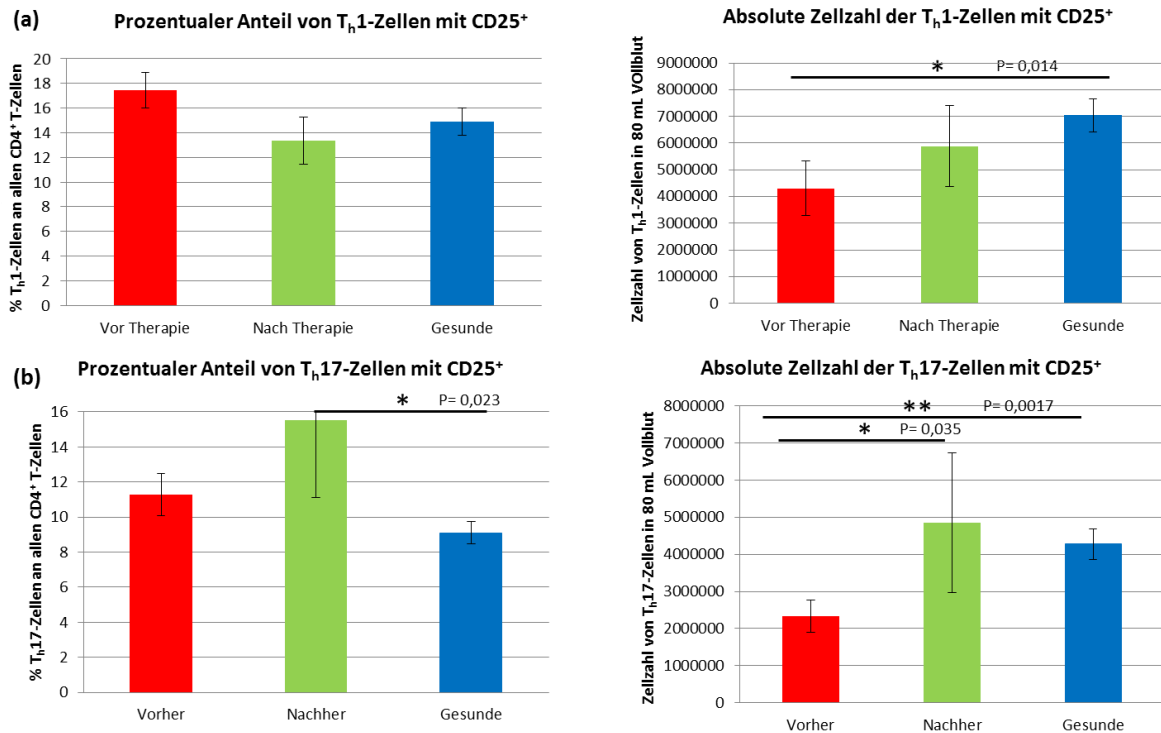
Da T-Effektorzellen bei Aktivierung vermehrt CD25 exprimieren, zur Charakterisierung der Subpopulationen jedoch nur Zellen mit verminderter CD25-Expression eingeschlossen wurden (siehe Gating-Strategie Kapitel 5.5.1) sollten nun auch all diejenigen Zellen berücksichtigt werden, die eine höhere CD25-Expression aufwiesen. So wurden also auch aktive T-Effektorzellen in die Statistik mit aufgenommen (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Gating aktive T-Effektorzellen**

Unter allen CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden nun zur Charakterisierung von T-Effektorzellen nun auch Zellen mit erhöhter CD25-Expression eingeschlossen (also alle).

Unter Ausschluss der CD25<sup>high</sup> Zellen wurde in Kapitel 6.2.1. gezeigt, dass es zwischen den Gruppen keinen Unterschied gab in der absoluten Zellzahl der T<sub>h</sub>1-Zellen oder deren prozentualer Anteil an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Berücksichtigt man nun jedoch zusätzlich auch die CD25<sup>high</sup> Zellen, so wird ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten vor der Therapie und gesunden Probanden sichtbar. Gesunde besitzen den Ergebnissen nach unter Berücksichtigung der aktiven T<sub>h</sub>1-Zellen in absoluten Zahlen mehr T<sub>h</sub>1-Zellen als erkrankte Patienten ( $p=0,014$ ). Auch das Einbeziehen aktiver CD25<sup>+</sup> T<sub>h</sub>1-Zellen ändert aber nicht den prozentualen Anteil an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen dargestellt werden (Abbildung 30a). Bezüglich der T<sub>h</sub>17-Zellen zeigten sich nahezu die gleichen Ergebnisse wie unter Ausschluss der CD25<sup>high</sup> Zellen: Die absolute Zellzahl der T<sub>h</sub>17-Zellen war bei Patienten vor der Therapie signifikant niedriger als bei Patienten nach der Therapie ( $p=0,035$ ) oder Gesunden ( $p=0,0017$ ).



**Abbildung 30: Aktive T-Effektorzellen (CD25<sup>high</sup>)**

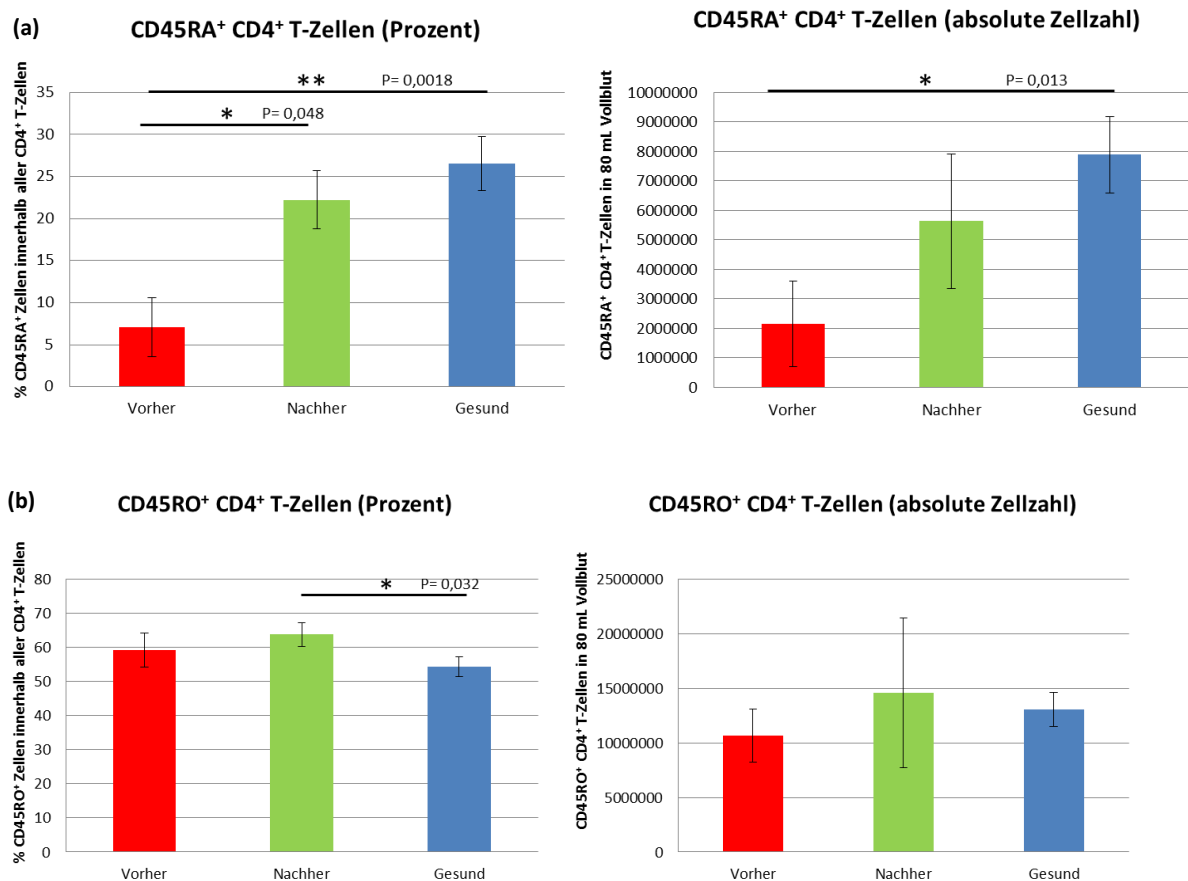
Vergleich aller T<sub>H</sub>1-Zellen (a) und T<sub>H</sub>17-Zellen (b) unter Einbeziehung aller Zellen mit hoher CD25-Expression: Vorher n=20, nachher n=9, Gesunde n=19. Patienten, die nach der Therapie keine vollständige Remission zeigten, wurde aus der Statistik ausgeschlossen. Die Ergebnisse der T<sub>H</sub>1-Zellen (a) zeigten, dass gesunde Probanden in absoluten Zahlen mehr T<sub>H</sub>1-Zellen besaßen wenn man die aktiven T<sub>H</sub>1-Zellen miteinbezieht (p=0,014). Die Ergebnisse der T<sub>H</sub>17-Zellen veränderten sich durch die Einbeziehung CD25- aktiver T<sub>H</sub>17-Zellen nicht: Auch hier konnte im Vergleich zu Patienten vor der Behandlung eine signifikant höhere absolute Zellzahl von T<sub>H</sub>17-Zellen bei Gesunden (p=0,00017) und Patienten nach der Therapie (p=0,035) gezeigt werden.

## 5.3 CD45-Isoformen auf T-Zellen

### 5.3.1 CD45RA/RO<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Zellen wurden weiterhin hinsichtlich ihrer Expression von CD45RA und CD45RO untersucht, um ein genaueres Bild über ihren Aktivitätszustand zu bekommen. CD45RA findet man auf „naiven“, geringgradig aktivierten T-Zellen und CD45RO auf aktivierten T-Zellen und Gedächtnis- T-Zellen. Zunächst wurde dafür die Population CD4<sup>+</sup> T-Zellen betrachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass gesunde Probanden sowohl prozentual als auch in absoluten Zellzahlen deutlich mehr naive CD45RA<sup>+</sup> Zellen besaßen, als Psoriasis-Patienten vor der Therapie. Der Anteil CD45RA<sup>+</sup> Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen stieg nach dreimonatiger Therapie deutlich an (Abbildung 31a). Bei psoriatisch veränderten Hauterscheinungen scheint es also weniger naive/geringgradig aktivierte T-Zellen im Blut zu geben als bei nicht betroffener Haut. Es konnte jedoch nicht bewiesen werden, dass sich im

Gegensatz die Anzahl oder der prozentuale Anteil aktiver CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen in gleichem Maße reduzierte wie der verzeichnete Anstieg inaktiver CD45RA<sup>+</sup> Zellen. Wirft man einen Blick auf die FACS Dotblots (siehe Abbildung 8) der CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Zellen, so wird deutlich, dass die einzelnen Populationen ineinander übergehen, also auch doppelt positive und doppelt negative Zellen vorhanden sind. So ließe sich erklären, wieso es zwar bei Gesunden und therapierten Patienten mehr inaktive CD45RA<sup>+</sup> Zellen gab als bei Erkrankten, es jedoch nicht zu einer gegensätzlichen Reduktion von aktiven T-Zellen, die nur CD45RO exprimieren, kam.



**Abbildung 31: CD45RA/RO CD4<sup>+</sup> T-Zellen:**

Darstellung der CD45RA/RO-Expression bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen: Vorher n= 7, nachher n=10, Gesunde n=20. In (a) ist links der prozentuale Anteil CD45RA-exprimierender Zellen an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Gesunde hatten einen deutlich höheren Anteil als Patienten vor der Therapie (p= 0,0018), auch die systemische Therapie zeigte einen merklichen Anstieg (p=0,048). Die absolute Zellzahl (rechts) ist ebenfalls bei Gesunden höher als bei vortherapierten Patienten (p=0,013). Eine Reduktion aktiver CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen (b) konnte jedoch nicht bewiesen werden.

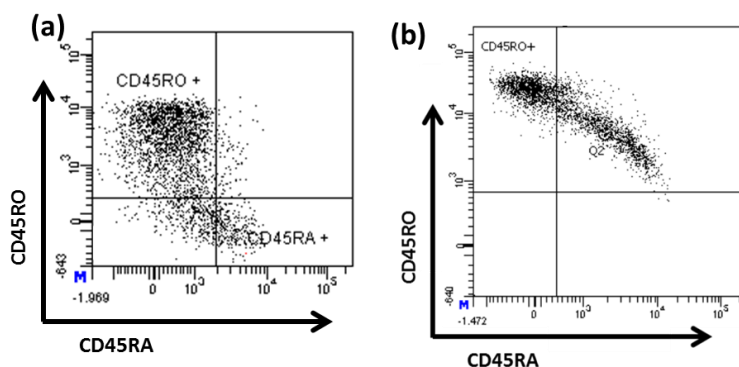
### 5.3.2 Aktivierungsstatus von T-Effektor und regulatorische T-Zellen

In einem weiteren Schritt wurde auch die CD45RA/RO-Expression der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen ermittelt. Abbildung 33 zeigt den prozentualen Anteil CD45RO und



CD45RA-exprimierender Zellen innerhalb der jeweiligen Subpopulation, aufgeteilt nach den drei Gruppen. In dieser Darstellung wird zunächst deutlich, dass alle drei Gruppen deutlich mehr aktive CD45RO<sup>+</sup> Zellen besitzen als CD45RA<sup>+</sup> Zellen. Vor der Therapie waren besonders T<sub>h</sub>17-zellen aktiv, war der Anteil CD45RO<sup>+</sup> T<sub>h</sub>17-Zellen doch deutlich höher als von T<sub>h</sub>1-zellen ( $p=0,021$ ) oder Tregs ( $p=0,023$ ). Selbiges galt auch für Patienten nach der Therapie. Hier waren die Unterschiede zwischen T<sub>h</sub>17-Zellen und T<sub>h</sub>1-Zellen ( $p=0,0008$ ) bzw. Tregs ( $p<0,00005$ ) sogar noch größer. Schließlich wurde die dominierende Rolle aktiver T<sub>h</sub>17-zellen auch bei gesunden Probanden deutlich. Innerhalb dieser Subpopulation exprimierten nämlich auch bei Gesunden deutlich mehr Zellen CD45RO als T<sub>h</sub>1-Zellen ( $p=0,0004$ ), T<sub>h</sub>2-Zellen ( $p=0,0001$ ) oder Tregs ( $p<0,00005$ ).

Interessanterweise fanden sich bei allen drei Gruppen so gut wie keine CD45RA<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Abbildung 32). Dies mag auch daran liegen, dass in der Eingrenzungsstrategie alle CD25<sup>low</sup> T-Zellen ausgeschlossen wurden. Es wurden somit nur Zellen mit hoher CD25-Expression betrachtet, also Zellen mit ohnehin hoher Aktivität. Eine verminderte Expression von CD45RA scheint also schlüssig. In allen drei Gruppen konnte beobachtet werden, dass T<sub>h</sub>1- und T<sub>h</sub>2-Zellen signifikant mehr CD45RA<sup>+</sup> Zellen besaßen als T<sub>h</sub>17-Zellen oder Tregs. Die Tatsache, dass besonders T<sub>h</sub>17-Zellen eine hohe Expression von CD45RO aufweist, macht den niedrigen Anteil CD45RA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>17-Zellen plausibel.



**Abbildung 32: Gating für CD45RA und CD45RO**

Im direkten Vergleich der CD45-Expression für T-Effektorzellen (a) und Tregs (b) wird die fehlende Expression von CD45RA der Tregs deutlich, welche sich durch den vorherigen Ausschluss CD25<sup>low</sup> T-Zellen erklären lässt. Im Gegenzug besitzen Tregs (b) deutlich mehr CD45RA/CD45RO doppelt positive Zellen als T-Effektorzellen (a).

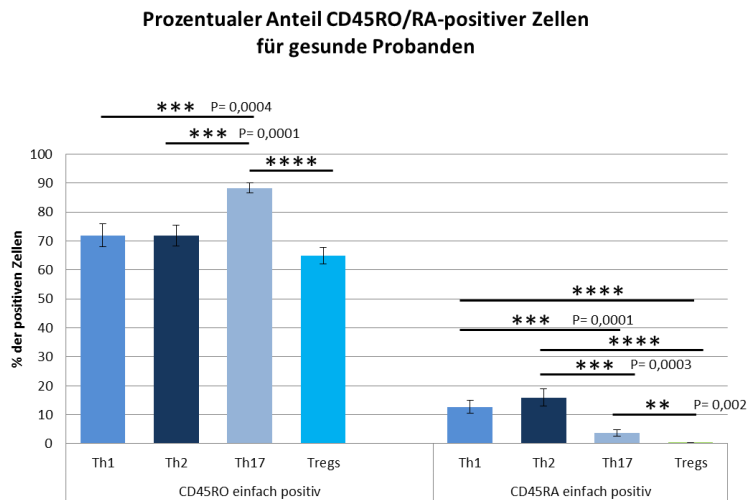
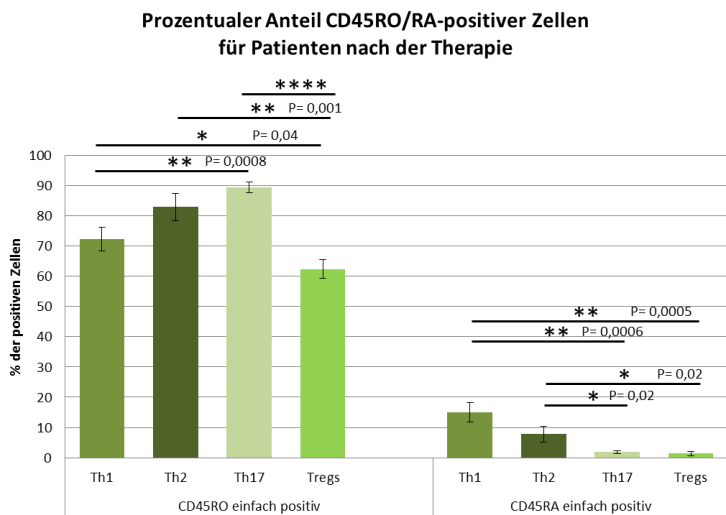
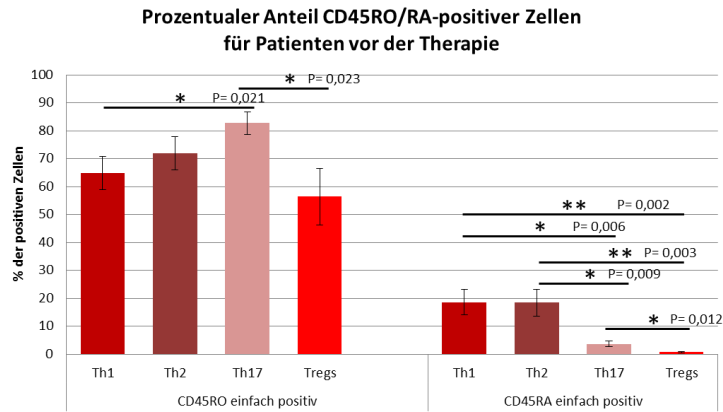
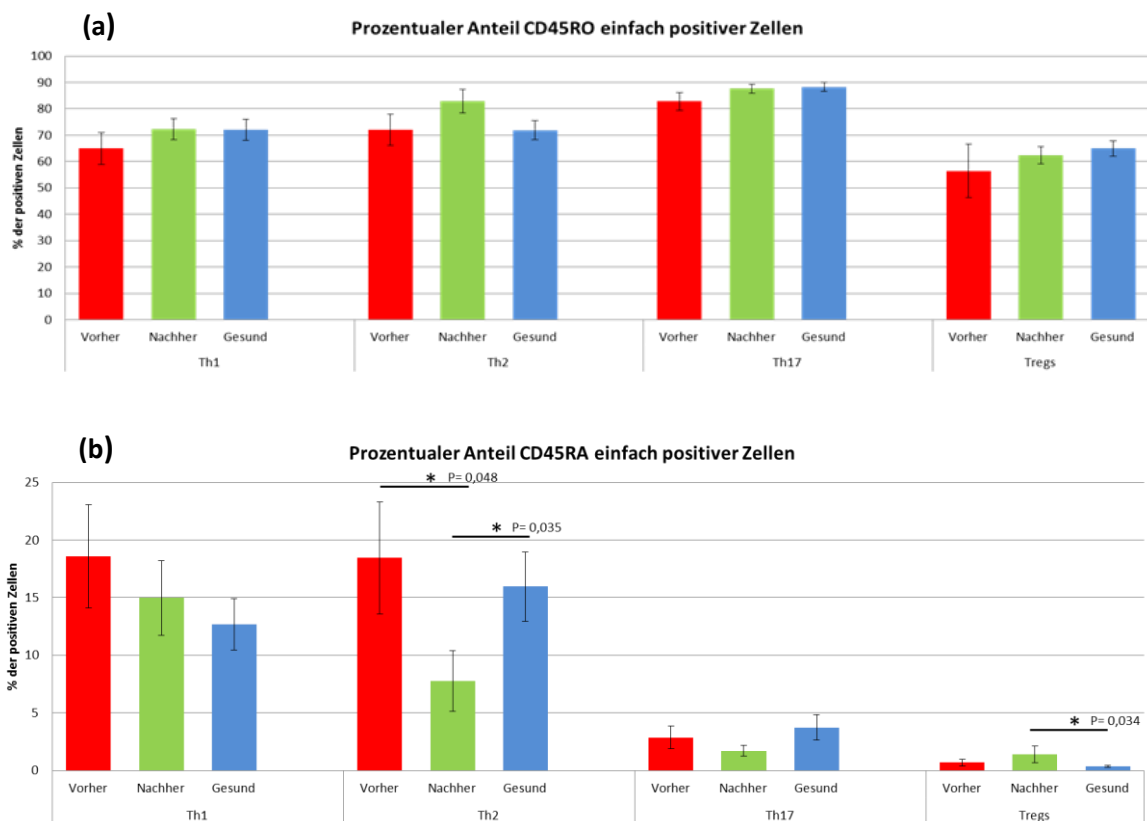


Abbildung 33: CD45RA und CD45RO

Abbildung des prozentualen Anteils CD45RO (links) oder CD45RA (rechts) exprimierender Zellen innerhalb der einzelnen Subpopulationen. In Rot sind die Werte der Patienten vor Therapie dargestellt (n= 7), nach der Therapie in grün (n=10), gesunde Probanden in blau (n=20). Bei allen Gruppen und allen Subpopulationen waren deutlich mehr CD45RO<sup>+</sup> Zellen als solche mit hoher CD45RA-Expression zu sehen. Während bei allen Gruppen Th<sub>17</sub>-Zellen die meisten Zellen mit CD45RO-Expression besaßen, hatten im Gegensatz Th<sub>1</sub> und Th<sub>2</sub>-Zellen einen Anteil an CD45RA<sup>+</sup> Zellen als Th<sub>17</sub>-Zellen. Regulatorische Zellen besaßen so gut wie keine CD45RA<sup>+</sup> Zellen.

In einer zweiten Darstellung (Abbildung 34) soll der direkte Vergleich der drei Gruppen für die jeweilige T-Zell-Population verdeutlicht werden. Dabei scheint es bezüglich der CD45RO-Expression zwischen den Gruppen keinen Unterschied zwischen gesunden Probanden und nicht therapierten Patienten bzw. eine Veränderung durch die Therapie zu geben. Einzig der Anteil inaktiver CD4RA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>2-Zellen scheinen nach systemischer Therapie gegenüber den Patienten vor Therapie aber auch gesunden Probanden signifikant reduziert zu sein (p=0,048 bzw. p=0,035).

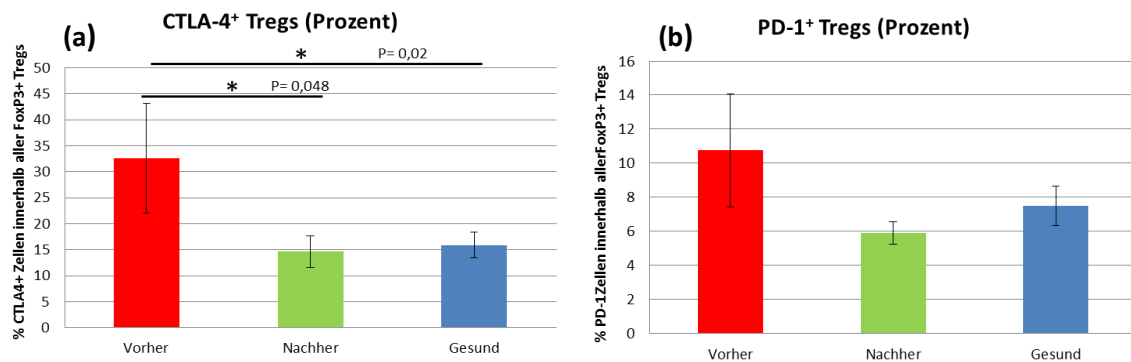


**Abbildung 34: Vergleich zwischen Gruppen der CD45RA/RO-positiven Zellen**  
 Vergleich der Expression von CD45RO (a) und CD45RA (b) zwischen den drei Gruppen Patienten vor der Therapie (n=7), nach der Therapie (n=10) und Gesunde (n=20). Aufgezeichnet ist der prozentuale Anteil CD45RA/RO<sup>+</sup> Zellen innerhalb aller T<sub>h</sub>1-, T<sub>h</sub>2-, T<sub>h</sub>17-Zellen oder Tregs. Für die CD45RO-Expression der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden. Lediglich der Anteil CD45RA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>2-Zellen war bei Patienten drei Monate nach systemischer Therapie signifikant niedriger als bei Patienten vor der Therapie (p=0,048) oder Gesunden (p= 0,035).

## 5.4 CTLA-4 und PD-1<sup>+</sup> Zellen

Die regulatorischen T-Zellen wurden zusätzlich noch hinsichtlich ihrer Expression der immunmodulierenden Proteine CTLA-4 und PD-1 untersucht. Während die Expression des PD-1 keinen Unterschied zwischen den Gruppen verzeichnete, konnte doch gezeigt werden, dass der Anteil CTLA-4<sup>+</sup> Tregs innerhalb aller gemessenen Foxp3<sup>+</sup> Tregs bei Psoriasis-Patienten signifikant höher ist, als bei Gesunden (p= 0,02). Interessanterweise schien sich

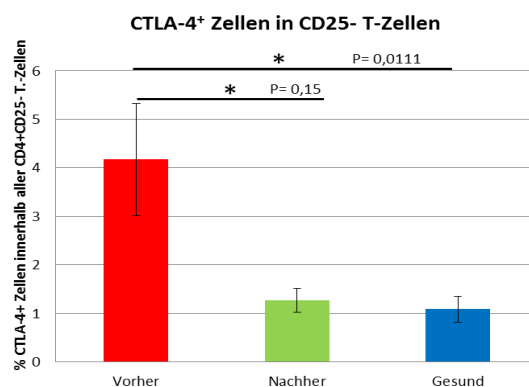
der Anteil CTLA-4<sup>+</sup> Tregs durch die Therapie wieder auf das Niveau gesunder Probanden zu bringen ( $p= 0,02$ ). Bei hoher Krankheitsaktivität scheinen regulatorische T-Zellen also inhibierende Moleküle wie CTLA-4 also vermehrt zu exprimieren, während dies bei Gesunden und therapierten Patienten weniger der Fall ist.



**Abbildung 35: CTLA-4<sup>+</sup> und PD-1<sup>+</sup> Tregs**

Darstellung des prozentualen Anteils CTLA-4-exprimierender (a) und PD-1-exprimierender Tregs (b): Vorher  $n=7$ , nachher  $n=10$ , Gesund  $n=20$ . Während keine nennenswerten Unterschiede in der PD-1-Expression beobachtet werden konnten, zeigte sich, dass betroffene Patienten signifikant mehr CTLA-4<sup>+</sup> Tregs besaßen als Patienten nach der Therapie ( $p= 0,048$ ) oder gesunde Probanden ( $p= 0,02$ ).

Weiterhin sollte ermittelt werden, ob sich auch die CTLA-4-Expression der T-Effektorzellen verändert hat. Dafür wurden CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen untersucht. Durch die gezielte Eingrenzung von CD25<sup>-</sup> T-Zellen sollten die CD25<sup>+</sup> Tregs aus der genaueren Betrachtung ausgeschlossen werden. Auch in der Gruppe CD25<sup>-</sup> T-Zellen konnte beobachtet werden, dass Patienten mit psoriatischen Hautveränderungen einen wesentlich höheren Anteil CTLA-4-exprimierender zirkulierender Zellen hatten als gesunde Probanden ( $p= 0,011$ ). Des Weiteren führte auch hier die systemische Therapie zu einer Reduktion ( $p= 0,015$ ).



**Abbildung 36: CTLA-4<sup>+</sup> und PD-1<sup>+</sup> T-Zellen in CD25<sup>-</sup> T-Zellen**

Prozentualer Anteil CTLA-4-exprimierender Zellen innerhalb aller CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen: Vorher  $n=7$ , nachher  $n=10$ , Gesunde  $n=20$ . Der Anteil von CTLA4<sup>+</sup> T-Zellen ist bei gesunden Probanden signifikant niedriger als bei betroffenen Patienten ( $p= 0,011$ ). Auch die Therapie führte zu einer signifikanten Reduktion ( $p= 0,015$ ).



## 6 Diskussion

In dieser Studie erfolgte die Charakterisierung der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen anhand ihres vermuten Chemokinrezeptorprofils nach dem Vorbild der Arbeit von Sallusto et al. (131). Um die Ergebnisse nun richtig einzuordnen, muss zunächst auf die schwierige Vergleichbarkeit der jeweils beschriebenen Zellen eingegangen werden. Ein Vergleich mit ähnlichen Studien ist vor allem deshalb schwierig, da die T-Zell-Subpopulationen je nach Autor unterschiedlich definiert und bestimmt werden. Beispielsweise beruhen sich Autoren wie Luan et al. auf die Spiegel sezernierter Interleukine, wie beispielsweise IL-17 für  $T_H17$ -Zellen (141). Da diese jedoch nur einen indirekten Nachweis der T-Zellen darstellen und Interleukine keineswegs nur von einer bestimmten Subpopulation sezerniert werden, wurde in dieser Studie auf diese Form des Nachweises verzichtet. Transkriptionsfaktoren, die mit den jeweiligen T-Zellen in Verbindung gebracht werden, wurden von Luan et al. ebenfalls bestimmt (141). Während jedoch beispielsweise mit Hilfe des Rezeptorenprofils signifikante Unterschiede in der Gruppe der  $T_H1$ -Zellen ermittelt wurden, konnte dies bei der Bestimmung des für  $T_H1$ -Zellen charakteristischen Transkriptionsfaktor Tbet bei Luan et al. nicht beobachtet werden. Ein Vergleich mit der aktuellen Studie greift im Grunde genommen nur bei genauerer Betrachtung der gefärbten Oberflächenrezeptoren. Luan et al. färbten zum Nachweis von  $T_H1$ -Zellen neben CD4 auch IFN- $\gamma$  bzw. für  $T_H17$ -Zellen IL-17 an und bezogen sich somit auf das typische Zytokinprofil der jeweiligen Subpopulation (141).

In dieser Studie erfolgte die Charakterisierung der  $CD3^+/CD4^+$  T-Zellen anhand ihrer Chemokinrezeptoren mit Bezug auf den Ergebnissen von Sallusto et al (131). Durch Anfärben von CXCR3, CCR4, CCR6 und CCR10 erfolgte so eine Selektion genau derjenigen Zellen, welche auf die in der Literatur vorzufindenden Beschreibungen der T-Zellsubpopulationen zutreffen. Die Tatsache, dass in der Literatur unterschiedliche Nachweisverfahren der jeweiligen T-Zellen zu finden sind, macht deutlich, dass die eindeutige Identifizierung von T-Zell-Subpopulationen keineswegs klar definiert ist. Tatsächlich ist eine klare Abgrenzung dieser Zellen und der Versuch einer Gruppierung nicht mit letzter Sicherheit möglich. Wenn in dieser Studie also von  $T_H1$ -,  $T_H2$ - oder  $T_H17$ -Zellen die Rede ist, handelt es sich hier nicht zwangsläufig um die gleichen Zellen, die in anderen Studien nachgewiesen wurden. Ein Vergleich wird so nur bedingt möglich. Mit simultaner Färbung von insgesamt acht

Oberflächenmolekülen ist in dieser Studie der Versuch erfolgt, mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine möglichst exakte Eingrenzung der gesuchten Zellen durchzuführen. Das Einbeziehen mehrerer Marker sollte hier die Spezifität der Zellidentifizierung erhöhen. An dieser Stelle muss jedoch einmal die exakte Abgrenzung und Benennung von T-Zellsubpopulationen in Frage gestellt werden. Einige Autoren verzichten bereits auf diese Namensgebung und wenden sich eher einer beschreibenden Darstellung dieser Zellen zu. Anstatt beispielsweise von  $T_H17$ -Zellen zu sprechen, wäre im aktuellen Beispiel die exaktere Bezeichnung also eine  $CD3^+/CD4^+/CD25^{low}/CXCR3^-/CCR4^+/CCR6^+$  T-Zelle. Dies macht es natürlich für Modelle zur Abbildung der Pathogenese der Psoriasis schwieriger, ermöglicht jedoch letztlich eine genauere Abgrenzung und damit Vergleichbarkeit der Zellen. Weiterhin erlaubt diese Darstellung zudem die Abbildung einer gewissen Fluidität zwischen den jeweiligen Subpopulationen und macht deutlich, dass die Grenzen zwischen den T-Zellgruppen nicht eindeutig gesetzt sind. So wird bereits in der Literatur von  $T_H1T_H17$ -Zellen gesprochen, Zellen also, deren Beschreibung sowohl auf  $T_H1$ - als auch auf  $T_H17$ -Zellen zutreffen. So sollen sie zwar CCR6, nicht aber CCR4 exprimieren und neben IL-17 auch IFN- $\gamma$  produzieren (142). Insgesamt bleibt es also trotz aller Bemühungen einer einheitlichen Definition nicht eindeutig ob Zellen, die zunächst als neue eigenständige Gruppe definiert wurden, in Wahrheit eine alternative Zustandsform einer bereits vorhandenen Zellpopulation darstellen könnten.

Bei einem Blick auf die Punktdiagramme (Dotblots) der Durchflusszytometrie in der aktuellen Studie wird die Schwierigkeit einer genauen Grenzziehung deutlich. Die Population der  $CD3^+/CD4^+$  T-Zellen beispielsweise lässt sich hier eindeutig abgrenzen. Kommt es jedoch zur Eingrenzung der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen, so ist eine klare Grenzziehung nur noch mit Hilfe eines Isotyps möglich. Besonders deutlich wird dies in der Gruppe der  $T_H22$ -Zellen. Diese zeichnen sich durch die Produktion von IL-22 mit Abwesenheit von IL-17 oder IFN- $\gamma$  aus. Jedoch besitzen sie wie die  $T_H17$ -Zellen ebenfalls den Chemokinrezeptor CCR4 und  $T_H17$ -Zellen sind wiederum ebenfalls in der Lage IL-22 zu produzieren (143). Die schwierige Abgrenzbarkeit dieser Zellen zeigte sich ferner in der durchgeführten FACS-Analyse, in der nur einige wenige  $T_H22$ -Zellen abgegrenzt werden konnten. Die wichtige Rolle der IL23- $T_H17/T_H22$ -Achse in der Entstehung und Behandlung der Psoriasis ist ausreichend belegt. Die Tatsache jedoch, dass im Gegensatz zu  $T_H17$ -Zellen nur ein marginaler Nachweis von  $T_H22$ -Zellen im Blut möglich war, lässt vermuten, dass der Beitrag dieser Zellen zum

Entzündungsgeschehen deutlich kleiner ausfällt, als der der T<sub>h</sub>17-Zellen. Möglich ist jedoch auch, dass die Darstellung der T<sub>h</sub>22-Zellen mit der durchgeführten Färbung nicht gelungen ist. In dieser Studie sollte durch Färbung des Chemokinrezeptors CCR10 eine Selektion von T<sub>h</sub>22-Zellen angestrebt werden. Die Beschreibung der T<sub>h</sub>17-Zellen als CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>low</sup>/CXCR3<sup>-</sup>/CCR4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> trifft jedoch streng genommen auch auf T<sub>h</sub>22-Zellen zu, da auch T<sub>h</sub>22-Zellen eine gewisse Expression von CCR6 aufweisen (143). Letztlich wurde allerdings auch in anderen wissenschaftlichen Abhandlungen beobachtet, dass sich nur wenige T<sub>h</sub>22-Zellen in PBMC nachweisen ließen und hier eine Untersuchung der Haut erfolgsversprechender sei (144).

In einigen Studien wurde bereits der Einfluss unterschiedlicher Therapieoptionen auf diverse T-Zellsubpopulationen sowie der Unterschied zwischen gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten hinsichtlich ihrer T-Zellen untersucht. Luan et al. beispielsweise konnten eine signifikante Erhöhung von T<sub>h</sub>1- und T<sub>h</sub>17-Zellen im Blut von unbehandelten Psoriasis-Patienten beobachten (141). Diese würden zudem mit dem Schweregrad der Psoriasis korrelieren. Nach einer mehrmonatigen Therapie mit Adalimumab sei es zur deutlichen Reduktion dieser Zellen gekommen. Auch Piaserico et al. erzielten ähnliche Ergebnisse, wobei hier lediglich die IL-17 Sekretion untersucht wurde und nicht die Frequenzen der Zellen anhand von CCR Expressionen von PBMC (145). Ob in der von ihnen beschriebenen Zellpopulation auch IFN $\gamma$  produzierende T<sub>h</sub>1T<sub>h</sub>17-Zellen dabei sind, ist nicht sicher auszuschließen. Aber auch Studien, die sich auf eine ähnlichen Nachweis mit Hilfe der Chemokinrezeptoren stützen, verzeichnen eine erhöhte Frequenz von T<sub>h</sub>17-Zellen bei Psoriatikern im Vergleich zu Gesunden (146). Dies steht nun im Gegensatz zu den Ergebnissen der aktuellen Studie. Während hinsichtlich der T<sub>h</sub>1-Zellen keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden konnte, scheint sowohl die absolute Anzahl als auch der prozentuale Anteil der T<sub>h</sub>17-Zellen bei Psoriasis-Patienten vor der Therapie signifikant niedriger zu sein als bei behandelten Patienten und den gesunden Probanden. Dies spiegelte sich ebenfalls in den Zahlen der CD4<sup>+</sup> Zellen nieder. So zeigten gesunde Probanden sowie behandelte Patienten einen signifikant höheren Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen an allen PBMC als unbehandelte Psoriasis-Patienten ( $p=0,000036$  und  $p=0,039$ ). Schon allein die Tatsache, dass Patienten mit einer aktiven Psoriasis-erkrankung einen geringeren Anteil an CD4<sup>+</sup> Zellen haben, erklärt, weshalb die absoluten Zahlen der jeweiligen T-Zellsubpopulationen in dieser Gruppe niedriger ausfallen. Doch wie lässt sich die



Beobachtung erklären, dass sich bei entzündlichen Hautveränderungen weniger CD4<sup>+</sup> Zellen im Blut befinden? Ein möglicher Grund, weshalb der Anteil dieser Zellen im Blut bei gesunden Probanden höher ist als bei unbehandelten Patienten, könnte eine Migration dieser Zellen vom Blut ins betroffene Gewebe sein. So könnten die CD4<sup>+</sup> Zellen sich bei Patienten mit erythematosquamösen Plaques vermehrt in den betroffenen Hautarealen aufhalten, am Ort des entzündlichen Geschehens also. Der Anteil dieser Zellen im Blut wäre so gegenüber Probanden ohne Plaques niedriger. Nach Therapie und Abklingen der Entzündungsreaktion könnten dann durch fehlende Zytokine aus der Haut wieder weniger T-Zellen in die Haut migrieren und dementsprechend vermehrt im Blut zu finden sein. Dies könnte wiederum den höheren Anteil von T<sub>H</sub>17-Zellen bei Gesunden und Genesenen erklären. Eine parallele Untersuchung von CD4<sup>+</sup> Zellen in der Haut könnte diese These untermauern. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass der vor Therapie gemessene Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen positiv mit dem PASI-Score korreliert. Je ausgeprägter die Psoriasis, desto höher der Anteil dieser Zellen an allen PBMC. Dies widerspricht also der These, dass CD4<sup>+</sup> Zellen mit zunehmendem Entzündungsgeschehen in die Haut migrieren. Auch andere Studien wie beispielsweise Langewouters et al. konnten bei Patienten mit einer schwer ausgeprägten Psoriasis einen höheren prozentualen Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen feststellen, als bei Patienten mit milder Psoriasis oder der Kontrollgruppe (147). Die Datenlage ist also nicht ganz klar. Da die CD4<sup>+</sup> Zellen jedoch eine heterogene Gruppe an Zellen abbilden und die Schwere der Entzündung nicht allein auf CD4<sup>+</sup> Zellen sondern auf Zytokine der entzündeten Haut und deren „Pull“ in die Haut zurückzuführen ist, lohnt sich hier nun eine genauere Betrachtung. Schaut man sich nämlich CLA exprimierende CD4<sup>+</sup> Zellen an, welche sich auf dem Weg zur Haut befinden oder von der Haut ins Blut übergangen, so sieht man einen deutlich höheren Anteil bei unbehandelten Psoriasis-Patienten als bei Gesunden oder therapierten Patienten (beide  $p < 0,00005$ ). Unbeachtet der Tatsache also, dass Psoriatiker einen kleineren Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen im Blut haben, liefert die genauere Betrachtung dieser Zellen die wichtige Information, dass bei erkrankten Patienten mehr T-Zellen im entzündlichen Geschehen der Haut involviert sind als in den beiden übrigen Gruppen. Autoren wie Jokai et al. beispielsweise machen von dieser guten Korrelation CLA<sup>+</sup> Zellen mit dem entzündlichen Geschehen der Haut Gebrauch, um CLA exprimierende Zellen als frühen Erkennungsmarker einer wiederaufflammenden Entzündung unter systemischer Therapie zu diskutieren (148). Insofern lohnt es sich zur Beurteilung der Zellen im Zusammenhang mit einer Psoriasis auf

diejenigen Zellen zu achten, welche diesen Skin-Homing-Rezeptor exprimieren. Die von Psoriasis betroffene Haut sorgt also für ein Zytokinmilieu, welches zur einer Migration von CLA<sup>+</sup> Zellen in die Haut führt, die IL-17 produzieren und damit ihren Beitrag zum Entzündungsgeschehen leisten (136). Der Anteil CLA<sup>+</sup> Zellen innerhalb der einzelnen Subpopulationen ist sowohl für T<sub>h</sub>1-, T<sub>h</sub>2-, als auch für T<sub>h</sub>17-Zellen bei unbehandelten Patienten signifikant höher als bei gesunden Probanden (p=0,006; p=0,0006; p=0,007). Auch in der Literatur konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer aktiven Psoriasis einen höheren Anteil CLA<sup>+</sup> Zellen haben als die Kontrollgruppe (149). Zwar sind hier nicht exakt die gleichen Zellen nachgewiesen, es untermauert jedoch die herausragende Rolle dieses Skin-Homing-Rezeptors im Entzündungsgeschehen. Nach systemischer Therapie scheint dieser Anteil zu sinken, wenn auch nicht signifikant. Zwar wurden Patienten, welche drei Monate später keinen Therapieerfolg zu verzeichnen hatten, in einer zweiten Darstellung aus der Statistik ausgenommen, jedoch änderte sich hierbei nichts am Signifikanzniveau. Ein sichtbarer Therapieerfolg in Form von sinkenden CLA<sup>+</sup> T-Zellen nach Therapie könnte eventuell bei höherer Probandenzahl erreicht werden. Eysteinsdottir et al. konnten in ihrer Studie bereits eine signifikante Reduktion CLA<sup>+</sup> T-Zellen (Th1Th17 sowie Tc1Tc17) bei klinischer Besserung nachweisen (150).

In der aktuellen Studie erfolgte außerdem die Bestimmung von CD45, einer bestimmten Rezeptor-Tyrosinphosphatase, welche auf der Oberfläche aller zellkernhaltigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird. Ihre Expression bestimmter Isoformen des CD45 ist dabei abhängig vom Grad der Aktivierung, Reifung und Differenzierung der Zelle. Während naive Zellen eine Isoform namens CD45RA exprimieren, wird durch Aktivierung der Zelle die extrazelluläre Domäne dieses Moleküls in Teilen ersetzt, sodass die aktivierte Zelle nun CD45RO an ihrer Oberfläche präsentiert (138). Es lässt sich also zusammenfassen, dass naive T-Zellen eine vermehrte Expression von CD45RA und T-Gedächtnis-Zellen von CD45RO aufweisen. Bei der Untersuchung CD4<sup>+</sup> Zellen im Blut von Patienten und Probanden konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass in der Gruppe der unbehandelten Psoriatiker signifikant mehr CD4<sup>+</sup> Zellen CD45RA exprimierten als Gesunde. Gesunde hatten aber nicht zwangsweise mehr CD45RO exprimierende CD4<sup>+</sup> Zellen, da sie einen hohen Anteil CD45RA/CD45RO-doppelpositiver Zellen aufwiesen. Bei einem aktiven Entzündungsgeschehen in der Haut ließe sich zunächst vermuten, dass die nachgewiesenen T-Zellen im Blut eine erhöhte Expression von CD45RO aufweisen und sich in einem

aktivierten Zustand befinden. Dennoch scheint es, dass bei Patienten mit Psoriasis vermehrt naive CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen im Blut zirkulieren. Möglich ist eine Rekrutierung naiver T-Zellen, welche in die betroffenen Hautareale migrieren und von antigenpräsentierenden Zellen erst aktiviert werden müssen, um auch aktiv zum Entzündungsgeschehen beitragen zu können. Auch Zhang et al. beobachteten nämlich sowohl bei PBMCs als auch bei hämatopoetischen Stammzellen eine erhöhte CD45-Expression (151). Diese korrelierte sogar leicht mit dem PASI-Score. Bei der Untersuchung der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen wiesen jedoch alle untersuchten Subpopulationen eine deutlich höhere Expression von CD45RO gegenüber CD45RA auf. Besonders T<sub>h</sub>17-Zellen stachen im Vergleich zu den anderen Subpopulationen hervor und wiesen einen signifikant höheren Anteil CD45RO<sup>+</sup> Zellen auf. Dies unterstreicht die Tatsache, dass die nachgewiesenen T<sub>h</sub>17-Zellen, welche in der Pathogenese der Psoriasis eine herausragende Rolle spielen, sich auch in einem aktiven Zustand befinden und vermutlich aktiv im Entzündungsgeschehen involviert sind. Ein signifikanter Unterschied zwischen Gesunden und Erkrankten oder Psoriasis-Patienten vor und nach der Therapie konnte allerdings nicht beobachtet werden. Dies mag daran liegen, dass so differenzierte Zellen wie T<sub>h</sub>1, T<sub>h</sub>2- oder T<sub>h</sub>17-Zellen zwangsläufig alle schon eine T-Zellaktivierung erfahren haben, ganz unabhängig ob akut erkrankt oder gesund. Außerdem liegt auch hier die Vermutung nahe, dass CD45RO<sup>+</sup> ausdifferenzierte T-Zellen eher in der Haut zu finden sind. Langewouters et al konnten in ihrer Studie zeigen, dass mit steigendem PASI mehr CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen in den PBMC zu finden sind und der Anteil CD45RO<sup>+</sup> mit steigendem PASI eher abnimmt. Auch hier wird diskutiert, ob bei hoher Krankheitsaktivität die ausdifferenzierten T-Zellen, welche CD45RO exprimieren, eher in der Haut als im peripheren Blut zu finden sind (147).

Zudem muss bedacht werden, dass in den zitierten Studien der Effekt einer einzelnen Therapieoption, wie z.B. die der TNF- $\alpha$  Inhibitoren, analysiert wurde. In der aktuellen Studie lag der Fokus jedoch in der Untersuchung des allgemeinen Effekts einer systemischen Therapie und den Veränderungen nach Abklingen der Symptome. Die Patienten, welche zum Follow-up erschienen, erhielten zum einen Adalimumab (n=6), welches den Entzündungsmediator TNF- $\alpha$  abfing und so die Inflammation eindämmte. Andere wiederum wurden mit Methotrexat behandelt (n=5), einem Immunsuppressivum, welches als Folsäure-Antagonist die Zellteilung der Immunzellen hemmt. Ein Patient erhielt Ciclosporin A, welches durch verminderte IL-2-Produktion letztlich die Aktivierung von T-Lymphozyten hemmt.

Insgesamt wurden also unterschiedlichste Signalwege angesprochen, weshalb ein Vergleich der T-Zell-Veränderungen nach Therapie mit anderen Studien nur begrenzt möglich ist. Ein gleicher Einfluss auf die Zusammensetzung der T-Zell-Subpopulationen ist bei unterschiedlicher Therapie nicht zwingend zu erwarten. Da sich die angewendeten Therapeutika in der Studie zu heterogen zeigten, konnte bei Aufteilung der Probanden je nach erhaltener Therapie keine ausreichend große Anzahl an Probanden erreicht werden, um signifikante Unterschiede darzustellen. Ungeachtet dessen untermauert jedoch schon das Ergebnis dieser Studie, dass der Anteil CLA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>1-, T<sub>h</sub>2, und T<sub>h</sub>17-Zellen bei unbehandelten Patienten höher ist als bei Gesunden, deren wichtige Rolle in der Pathogenese der Psoriasis. Gerade T<sub>h</sub>17-Zellen und deren Signalwege sind jüngst in den Fokus neuerer Therapien gerückt (70). Durch die Sekretion von Interleukinen wie IL-17 leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Aktivierung der Keratinozyten und der nachfolgenden Hyperkeratose, welche zu den charakteristischen squamösen Plaques führt (46). Zudem scheint IL-17 die Bildung antimikrobieller Peptide zu induzieren, welche ebenfalls das Entzündungsgeschehen aufrechterhalten (152). Zusammenfassend decken sich also die gemessenen Zahlen der CLA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>17-Zellen mit diesen Beobachtungen und bestätigen deren zentrale Rolle in der Pathogenese der Psoriasis. Innerhalb der Gruppe unbehandelter Psoriasis-Patienten korrelierte die Zahl CLA<sup>+</sup> T<sub>h</sub>17-Zellen jedoch nicht mit dem Schweregrad der Psoriasis. Möglicherweise reicht auch hier die Anzahl von 20 Patienten nicht aus, um eine signifikante Korrelation darzustellen. Zudem ist fraglich, ob sich Zellen des peripheren Blutes generell eignen, um eine solche Korrelation mit dem Entzündungsgeschehen der Haut abzubilden. Um dieser Frage nachzugehen, wäre neben der Bestimmung der Zellen im Blut eine parallele Untersuchung betroffener Hautareale interessant. In jüngsten Studien wurde außerdem eine verminderte Häufigkeit von T<sub>h</sub>17-Zellen bei älteren Patienten gegenüber jüngeren beobachtet (153). Ob diese Tatsache die Ergebnisse dieser Studie mit einer Probandenrekrutierung von Patienten unterschiedlichen Alters beeinflusst, ist nicht sicher auszuschließen.

Neben T-Effektorzellen wurden in dieser Studie auch regulatorische T-Zellen untersucht, welche als CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>low</sup>/Foxp3<sup>+</sup> Zellen definiert wurden. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass anders als im murinen System im humanen System auch aktivierte T-Zellen Foxp3 exprimieren können und eine exakte Abgrenzung von Tregs erschwert. Ihnen kommt in der Pathogenese der Psoriasis eine entscheidende Rolle zu. Bereits in einigen

Studien konnte bewiesen werden, dass die Homöostase zwischen T-Effektorzellen, welche das Entzündungsgeschehen in der Haut vorantreiben, und der hemmenden und regulierenden Wirkung durch regulatorische T-Zellen, gestört ist (154). Dabei haben regulatorische T-Zellen nicht nur einen direkten Einfluss auf die T-Effektorzelle, sondern verhindert durch Einflussnahme auf die Aktivierung der antigenpräsentierenden Zelle (DC) von vornherein die Aktivierung und Differenzierung der jeweiligen T-Effektorzelle (155). Wie schon bei den vorherigen Ergebnissen zeigte sich auch bei den regulatorischen T-Zellen eine verminderte absolute Zellzahl bei unbehandelten Psoriasis-Patienten gegenüber den anderen Gruppen. Dies begründet sich abermals durch den wesentlich geringeren Anteil CD4<sup>+</sup> T-Zellen in dieser Gruppe. Betrachtet man jedoch den prozentualen Anteil der Tregs an allen CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird deutlich, dass der Anteil wiederum bei gesunden Probanden deutlich niedriger liegt als bei akut erkrankten oder genesenen Psoriasis-Patienten. Zhang et al konnten bei der Untersuchung pädiatrischer Patienten ähnliche Ergebnisse beobachten (156). In einer anderen Studie konnte sogar gezeigt werden, dass die Frequenz der Tregs mit dem PASI der Patienten positiv korreliert (157). Patienten mit einer Psoriasis wiesen prozentual mehr Tregs auf als Gesunde. Die Ergebnisse dieser Studien stützen deren Hypothese, dass die Erhöhung der Tregs als eine Art positiver Feedback-Mechanismus zu werten ist. Um gegen die ausschreitende Entzündung durch T<sub>h</sub>1-, T<sub>h</sub>2- und T<sub>h</sub>17-Zellen anzugehen, könnte es zu einer reaktiven Erhöhung der regulatorischen T-Zellen kommen. Da sich der Anteil an Tregs zwischen akut erkrankten und genesenen Psoriasis-Patienten nicht signifikant unterscheidet, liegt die Vermutung nahe, dass sich auch nach Remission nichts an den Verhältnissen ändert. Eine mögliche Hypothese für die weiterhin erhöhte Zellzahl nach Therapie wäre, dass die Empfindlichkeit der T-Effektorzellen gegenüber Tregs auch nach Remission unverändert niedrig bleibt. So bleibt die Zahl der Tregs nach Therapie unverändert hoch, um die Homöostase so gut es geht aufrecht zu erhalten. Wie auch bei den T-Effektorzellen wurde auch bei den regulatorischen Zellen die Expression von CD45RO und CD45RA gemessen. Bei den nachgewiesenen Tregs handelte es sich in allen drei Gruppen fast ausschließlich um CD45RO<sup>+</sup> aktivierte T-Zellen. Auffallend wenige Tregs zeigten eine reine Expression von CD45RA. Bei den nachgewiesenen Tregs handelte es sich also nicht um naive Zellen, sondern um Tregs, die bereits mit anderen Zellen in Kontakt gekommen sein müssen und ihrer regulierenden Aufgabe nachkommen. Ein signifikanter Unterschied zwischen erkrankten Patienten und Gesunden konnte aber auch hier nicht ermittelt werden.

Da bei der Betrachtung von regulatorischen T-Zellen auch die zu regulierenden Zellen mit einbezogen werden müssen, erfolgte auch eine Bestimmung der Korrelation dieser Zellen. Betrachtet man die Korrelation der Zellzahl regulatorischer T-Zellen und derer von T<sub>h</sub>1- oder T<sub>h</sub>17-Zellen, so lässt sich bei Psoriasis-Patienten vor und nach der Therapie eine positive Korrelation erkennen. Je mehr T-Effektorzellen nachgewiesen wurden, desto höher die Zellzahl der regulatorischen T-Zellen. Lediglich in der Gruppe der gesunden Probanden konnte eine solche Korrelation nicht beobachtet werden. Dies unterstützt die These, dass selbst die erfolgreiche Therapie der Psoriasis an dieser Situation nichts ändert und die Empfindlichkeit gegenüber regulatorischen T-Zellen unverändert niedrig bleibt und zu einer Erhöhung derselben führt. Mögliche Rezidive selbst nach erfolgreicher initialer Therapie könnten sich dadurch erklären lassen. Bei gesunden Probanden scheint es diesen positiven Feedback-Mechanismus nicht zu geben. Hier kommt es mit steigender Anzahl der T-Effektorzellen nicht zu einem Anstieg regulatorischer T-Zellen. An dieser Stelle muss betont werden, dass die Datenlage in der Literatur hinsichtlich einer gesteigerten oder verminderten Zahl der Tregs nicht eindeutig ist. So konnten in anderen Studien im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie oder den oben genannten von Zhang et al. tatsächlich weniger Tregs bei Psoriasis-Patienten nachgewiesen werden als bei Gesunden (158, 159). Dies mag zum einen in unterschiedlichen Nachweismethoden begründet sein. Nicht zuletzt kann jedoch auch eine fehlende Einheitlichkeit bezüglich des Bestimmungszeitpunkts der Grund für diese Unregelmäßigkeiten sein. Eine dynamische Veränderung der Zellzahl von Beginn bis zum Abklingen der Inflammation ist nicht unwahrscheinlich. So wäre auch in dieser Studie eine Betrachtung in mehreren Zeitpunkten während des akuten Entzündungsgeschehens und an weiteren Punkten nach Remission interessant. Betrachtet man nun die Korrelation zwischen regulatorischen T-Zellen und T<sub>h</sub>17-Zellen, so müssen auch jüngste Erkenntnisse bezüglich einer gewissen Fluidität zwischen diesen beiden Zellen in die Diskussion miteinbezogen werden. Bovenshen et al wiesen Foxp3<sup>+</sup> Zellen nach, welche ähnlich wie T<sub>h</sub>17-Zellen auch IL-17 synthetisierten (160). Die Hypothese lautet, dass regulatorische T-Zellen das Ausmaß der Foxp3-Expression vermindern, wenn sie einem Zytokinmilieu ausgesetzt sind, welches dem der Psoriasis ähnlich ist. Die Expression vom Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ T und IL-17 hingegen würden gesteigert werden. Es käme also zu einer Verschiebung von regulatorischen T-Zellen hin zu T<sub>h</sub>17-Zellen. Der Nachweis von Foxp3 und ROR $\gamma$ T co-exprimierenden Zellen legt nahe, dass die Übergänge fließend sind. IL-23 steht

im Verdacht diese Konversion voranzutreiben. Diese Beobachtungen könnten die fehlende Regulation zwischen Tregs und T-Effektorzellen erklären, welche letztlich die Pathogenese der Psoriasis beschleunigen und einen neuen Therapieansatz darstellen würde. Vor diesem Hintergrund stellt sich bei Betrachtung der aktuellen Studie die Frage, ob unter den nachgewiesenen Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen nicht auch solche darunter sind, welche eine Coexpression von Foxp3 und ROR $\gamma$ T aufweisen. Eine zusätzliche Bestimmung dieses für T<sub>h</sub>17-Zellen typischen Transkriptionsfaktors könnte in weiteren Versuchen das Verhältnis dieser beiden Zellen genauer abbilden.

Ungeachtet dessen lohnt sich jedoch die Frage, inwieweit weitere Mechanismen die Homöostase zwischen T-Effektorzellen und Tregs beeinträchtigen könnten. Wie von Zhang et al. geschildert könnte die durch das Zytokinmilieu gesteigerte Proliferation der T-Effektorzellen zu einer gewissen Resistenz gegenüber Tregs führen (157), andererseits konnte jedoch auch eine verminderte Aktivität von regulatorischen T-Zellen selbst nachgewiesen werden. Sugiyama et al. beispielsweise beobachteten eine verminderte Proliferation der Tregs von Psoriasis-Patienten nach Stimulation (161) und auch Zhang et al. führten in einem Experiment regulatorische T-Zellen betroffener Patienten mit T-Effektorzellen gesunder Probanden zusammen und wiesen eine eingeschränkte Inhibition der T-Zellen durch Tregs nach (157). Eine Hyperproliferation von T-Effektorzellen als alleiniger Grund der fehlgeleiteten Regulation scheint also unwahrscheinlich. Als mögliche Ursache dieser eingeschränkten Aktivität von Tregs kommt eine verminderte Produktion von löslichen Entzündungsmediatoren, die in der Inhibition der T-Effektorzellen eine tragende Rolle spielen, in Frage. Auch eine verminderte Expression von Oberflächenmolekülen wie CTLA-4 oder PD-1 ist möglich. Das Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) zum Beispiel bindet CD80/86 und verhindert so die Bindung dieses Komplexes an CD28 (125). Das kostimulierende Signal zur Aktivierung der T-Zelle wird also unterbunden. Das Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) hat ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die Produktion von IL-2 und damit die Aktivierung von T-Zellen (125). Dass sie eine wichtige Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen, ist ausreichend belegt. So haben zum Beispiel PD-1-knock-out-Mäuse ein erhöhtes Risiko Autoimmunerkrankungen wie Kardiomyopathien, Lupus oder Diabetes mellitus Typ I zu entwickeln (162). Ebenso gibt es Fallberichte von onkologischen Patienten, welche mit PD-1-Inhibitoren behandelt wurden und bei denen ein Wiederaufflammen von psoriatischen Plaques verzeichnet wurde (163).

So liegt also die Vermutung nahe, dass bei Patienten mit Psoriasis eine verminderte Expression von PD-1 zu erwarten wäre. Die nachgewiesenen Tregs der aktuellen Studie wiesen jedoch bei Psoriasis-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Expression von PD-1 auf. Gleiches gilt auch für die Expression von CTLA-4. Auch Peled et. al. konnten in T-Zellen von Patienten mit Psoriasisarthritis eine signifikant höhere Expression von PD-1 nachweisen als bei gesunden Probanden (164). Sie sehen in PD-1 einen Marker für die Aktivität der T-Zellen, auch wenn sich dies auf den ersten Blick nicht mit der inhibierenden Funktion dieses Rezeptors in Einklang bringen lässt. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Expression könnte ein positiver Feedbackmechanismus sein, um eine überschießende Aktivierung und letztlich die Entstehung von Autoimmunität zu verhindern. Sie konnten ebenfalls beobachten, dass die Expression negativ mit der Krankheitsaktivität korreliert. Je geringer die Expression von PD-1 war, desto ausgeprägter war die Psoriasisarthritis (164). Es scheint also so, dass die inhibierende Funktion von PD-1 und CTLA-4 eine wichtige Rolle spielt, um überschießende Immunreaktionen und schließlich die Entstehung von Psoriasis zu verhindern. Eine Korrelation mit dem PASI wurde in der aktuellen Studie nicht bestimmt. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass das allgemeine Niveau der PD-1 und CTLA-4 Expression bei erkrankten Patienten deutlich höher liegt als bei Gesunden. Dies bestätigt die Theorie, dass die vermehrte Expression dieser Oberflächenmoleküle einen Versuch darstellt, um im Sinne eines positiven Feedbacks dem unkontrollierten Treiben der T-Effektorzellen entgegenzustehen. Eine richtige Dysfunktion der regulatorischen T-Zellen lässt sich daraus jedoch nicht ableiten. Ob die Expression von CTLA-4 und PD-1 gesteigert wird, weil die inhibierende Funktion ineffektiv ist, lässt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen. Die Dysbalance zwischen T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen sowie die Frage, ob die Inflammation der Haut letztlich durch ein Versagen der inhibierenden Funktion der Tregs oder durch die Überstimulation von T-Zellen zustande kommt, bleibt noch Gegenstand weiterer Untersuchungen. Letztendlich kann die Expression von CTLA-4 beispielsweise auch ein Aktivierungszustand der Zelle darstellen. Diese Marker sind vor allem auch dann von Bedeutung, wenn man sich die Funktion der regulatorischen T-Zellen anschaut. Nicht alle regulatorischen T-Zellen haben nämlich eine rein inhibierende Funktion. Sanchez et al. beispielsweise betrachteten regulatorische T-Zellen in der Haut (sogenannte memory T-cells), welche vermehrt CTLA-4 und IL-17 exprimieren (165). Ob diese Zellen letztlich aus regulatorischen T-Zellen differenzierte T<sub>h</sub>17-Zellen sind und ob sie



zum weiteren Entzündungsgeschehen beitragen oder gar Teil der Genesung sind, bleibt offen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die in dieser Studie eine Erhöhung von CLA<sup>+</sup>-Zellen sowie der T<sub>h</sub>17- und CD45RO<sup>+</sup> Zellen beobachtet wurde. Dies legt nahe, dass im Rahmen des entzündlichen Geschehens in der Psoriasis T-Helfer-Zellen ausdifferenziert werden, welche schließlich in die Haut migrieren. Diese Beobachtungen korrelieren zum Teil mit den Aussagen anderer Untersuchungen. Aber man muss bedenken, dass unterschiedliche Studiendesigns, insbesondere die Zusammensetzung der Studienpopulation, dazu führen können, dass die Charakterisierung der jeweiligen T-Zell-Subtypen von Studie zu Studie eine hohe Variation aufweisen kann. .

## **7 Limitationen der Studie**

Zum Abschluss lohnt sich ein kritischer Rückblick in Bezug auf die Datenerhebung und die Limitationen der Interpretation, die damit einhergehen. Sie dienen als Vorschläge für weitere Folgestudien. So fehlt beispielsweise in der Betrachtung aller CD3<sup>+</sup> Zellen ein Outgate für Natürliche Killerzellen, die ebenfalls CD3 exprimieren, nicht aber Gegenstand der Untersuchung in Bezug auf Psoriasis sind. Schließlich ist eine Charakterisierung der T-Zellen allein anhand ihres Chemokinrezeptorprofils nur eingeschränkt möglich. Für die Subpopulation typische Transkriptionsfaktoren beispielsweise sind nicht untersucht worden. Eine Multiparametermessung mit fünfzehn oder mehr Farbstoffen könnte für eine exaktere Charakterisierung der jeweiligen Zellen sorgen und genauere Abgrenzungen erlauben. Um die Ergebnisse in die Pathogenese der Psoriasis ganzheitlich einordnen zu können, sollten sich die Untersuchungen schließlich nicht nur auf periphere T-Zellen im Blut beschränken, sondern durch Hautstanzen betroffener Areale auch die Zusammensetzung der Zellen in der Haut betrachtet werden.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Burg G, Geiges M. Lepra vulgaris. History of psoriasis. *Journal of the Turkish Academy of Dermatology*. 2014;8(3):1483r1.
2. Augustin M, Glaeske G, Radtke M, Christophers E, Reich K, Schäfer I. Epidemiology and comorbidity of psoriasis in children. *British Journal of Dermatology*. 2010;162(3):633-6.
3. Weinstein GD, McCullough JL, Ross PA. Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 1985;85(6):579-83.
4. Rapp SR, Feldman SR, Exum ML, Fleischer Jr AB, Reboussin DM. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999;41(3):401-7.
5. Takeshita J, Grewal S, Langan SM, Mehta NN, Ogdie A, Van Voorhees AS, et al. Psoriasis and comorbid diseases: epidemiology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2017;76(3):377-90.
6. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet*. 2007;370(9583):263-71.
7. Nestle F, Kaplan D, Schon M, Barker J: Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361(17):496-509.
8. Weinstein GD, van Scott EJ. Autoradiographic analysis of turnover times of normal and psoriatic epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 1965;45(4):257-62.
9. De Rosa G, Mignogna C. The histopathology of psoriasis. *Reumatismo*. 2007;59(s1):46-8.
10. Boehncke W, Schön M. Psoriasis. *Lancet* [Internet]. 2015; 386 (9997): 983–94.
11. Ferrelli C, Pinna AL, Pilloni L, Tomasini CF, Rongioletti F. Histopathological aspects of psoriasis and its uncommon variants. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia*. 2017;153(2):173-84.
12. Bernhard JD. Clinical pearl: Auspitz sign in psoriasis scale. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1997;36(4):621.
13. Henes JC, Ziupa E, Eisfelder M, Adamczyk A, Knaudt B, Jacobs F, et al. High prevalence of psoriatic arthritis in dermatological patients with psoriasis: a cross-sectional study. *Rheumatology international*. 2014;34(2):227-34.
14. Brockbank JE, Stein M, Schentag CT, Gladman DD. Dactylitis in psoriatic arthritis: a marker for disease severity? *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(2):188-90.
15. Reich K. Approach to managing patients with nail psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2009;23:15-21.
16. Baran R. The burden of nail psoriasis: an introduction. *Dermatology*. 2010;221(Suppl. 1):1-5.
17. Tan ES, Chong W-S, Tey HL. Nail psoriasis. *American journal of clinical dermatology*. 2012;13(6):375-88.
18. Lønnberg AS, Skov L, Skytthe A, Kyvik K, Pedersen O, Thomsen S. Heritability of psoriasis in a large twin sample. *British Journal of Dermatology*. 2013;169(2):412-6.
19. Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;140(3):645-53.
20. Menter A. Psoriasis and psoriatic arthritis overview. *Am J Manag Care*. 2016;22(8 Suppl):s216-s24.
21. Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *International journal of dermatology*. 2010;49(12):1351-61.
22. Mahler V, Diepgen T, Skudlik C, Becker D, Dickel H, Fartasch M, et al. Psoriasis als anlagebedingte Erkrankung in der berufsdermatologischen Beurteilung. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2014;12(6):519-30.
23. Bos J, Hulsebosch H, Krieg S, Bakker P, Cormane R. Immunocompetent cells in psoriasis. *Archives of dermatological research*. 1983;275(3):181-9.
24. Kim T-G, Kim DS, Kim H-P, Lee M-G. The pathophysiological role of dendritic cell subsets in psoriasis. *BMB reports*. 2014;47(2):60.

25. Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, Boasson M, Saint Andre JP, Verret JL. Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Archives of dermatology*. 1990;126(11):1523-.
26. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(6):1475.
27. Morizane S, Gallo RL. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. *The Journal of dermatology*. 2012;39(3):225-30.
28. Büchau AS, Gallo RL. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clinics in dermatology*. 2007;25(6):616-24.
29. Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, et al. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(1):135-43.
30. Hänsel A, Günther C, Ingwersen J, Starke J, Schmitz M, Bachmann M, et al. Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;127(3):787-94. e9.
31. Van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *The Journal of Immunology*. 2009;182(9):5836-45.
32. Lande R, Botti E, Jandus C, Dojcinovic D, Fanelli G, Conrad C, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nature communications*. 2014;5(1):1-16.
33. Lowes M, Suárez-Fari nas M, Krueger JG. *Immunology of psoriasis Annu Rev Immunol*. 2014;32:227-55.
34. Arakawa A, Siewert K, Stöhr J, Besgen P, Kim S-M, Rühl G, et al. Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *Journal of Experimental Medicine*. 2015;212(13):2203-12.
35. Fuentes-Duculan J, Bonifacio KM, Hawkes JE, Kunjraiva N, Cueto I, Li X, et al. Autoantigens ADAMTSL 5 and LL 37 are significantly upregulated in active Psoriasis and localized with keratinocytes, dendritic cells and other leukocytes. *Experimental dermatology*. 2017;26(11):1075-82.
36. Yunusbayeva M, Valiev R, Bilalov F, Sultanova Z, Sharipova L, Yunusbayev B. Psoriasis patients demonstrate HLA-Cw\* 06: 02 allele dosage-dependent T cell proliferation when treated with hair follicle-derived keratin 17 protein. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-7.
37. Neuner P, Urbanski A, Trautinger F, Möller A, Kirnbauer R, Kapp A, et al. Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 1991;97(1):27-33.
38. Yao Y, Richman L, Morehouse C, De Los Reyes M, Higgs BW, Boutrin A, et al. Type I interferon: potential therapeutic target for psoriasis? *PloS one*. 2008;3(7):e2737.
39. Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Stuart PE, Tejasvi T, et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010;130(5):1213-26.
40. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
41. Nickoloff BJ. The cytokine network in psoriasis. *Archives of dermatology*. 1991;127(6):871-84.
42. Reich K, Nestle FO, Papp K, Ortonne J-P, Evans R, Guzzo C, et al. Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial. *The Lancet*. 2005;366(9494):1367-74.
43. Collamer AN, Guerrero KT, Henning JS, Battafarano DF. Psoriatic skin lesions induced by tumor necrosis factor antagonist therapy: a literature review and potential mechanisms of action. *Arthritis Care & Research: Official Journal of the American College of Rheumatology*. 2008;59(7):996-1001.
44. Nestle F, Zheng X-G, Thompson C, Turka L, Nickoloff B. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *The Journal of Immunology*. 1993;151(11):6535-45.
45. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon- $\gamma$ , interleukin-2, and tumor

necrosis factor- $\alpha$ , defining TC1 (Cytotoxic T Lymphocyte) and TH1 effector populations: 1 a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999;113(5):752-9.

46. Teunissen MB, Bos JD, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA. Interleukin-17 and interferon- $\gamma$  synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998;111(4):645-9.

47. Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Aphale A, Vatan L, et al. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN- $\gamma$ : mechanism and pathological relevance in psoriasis. *The Journal of Immunology*. 2008;181(7):4733-41.

48. Keijsers RR, Hendriks AG, Van Erp PE, Van Cranenbroek B, Van De Kerkhof PC, Koenen HJ, et al. In vivo induction of cutaneous inflammation results in the accumulation of extracellular trap-forming neutrophils expressing ROR $\gamma$ t and IL-17. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(5):1276-84.

49. Schön MP. The plot thickens while the scope broadens: a holistic view on IL-17 in psoriasis and other inflammatory disorders. *Experimental dermatology*. 2014;23(11):804-6.

50. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, et al. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *The Journal of Immunology*. 2011;187(1):490-500.

51. Rizzo HL, Kagami S, Phillips KG, Kurtz SE, Jacques SL, Blauvelt A. IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A. *The journal of immunology*. 2011;186(3):1495-502.

52. Ha H-L, Wang H, Pisitkun P, Kim J-C, Tassi I, Tang W, et al. IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(33):E3422-E31.

53. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Farinas M, Nogales KE, Tian S, Cardinale I, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF- $\alpha$  in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011;131(3):677-87.

54. Nogales KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;123(6):1244-52. e2.

55. Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European journal of immunology*. 2006;36(5):1309-23.

56. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature immunology*. 2007;8(4):345-50.

57. Singh K, Gatzka M, Peters T, Borkner L, Hainzl A, Wang H, et al. Reduced CD18 levels drive regulatory T cell conversion into Th17 cells in the CD18hypo PL/J mouse model of psoriasis. *The Journal of Immunology*. 2013;190(6):2544-53.

58. Asadullah K, Sabat R, Friedrich M, Volk HD, Sterry W. Interleukin-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. 2004;3(2):185-92.

59. Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2009;61(3):451-85.

60. Papp K, Gulliver W, Lynde C, Poulin Y, Ashkenas J. Canadian guidelines for the management of plaque psoriasis: overview. *Journal of cutaneous medicine and surgery*. 2011;15(4):210-9.

61. Ashcroft DM, Po ALW, Williams HC, Griffiths CE. Systematic review of comparative efficacy and tolerability of calcipotriol in treating chronic plaque psoriasis. *Bmj*. 2000;320(7240):963-7.

62. Brand N, Petkovich M, Krust A, Chambon P, de Thé H, Marchio A, et al. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*. 1988;332(6167):850-3.

63. Gesser B, Johansen C, Rasmussen MK, Funding AT, Otkjaer K, Kjellerup RB, et al. Dimethylfumarate specifically inhibits the mitogen and stress-activated kinases 1 and 2 (MSK1/2): possible role for its anti-psoriatic effect. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(9):2129-37.
64. Lehmann JC, Listopad JJ, Rentzsch CU, Igney FH, von Bonin A, Hennekes HH, et al. Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(4):835-45.
65. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, et al. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- $\kappa$ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *Journal of neuroimmunology*. 2015;283:74-85.
66. Oehrl S, Olaru F, Kunze A, Maas M, Pezer S, Schmitz M, et al. Controlling the pro-inflammatory function of 6-sulfo LacNAc (sIa<sub>N</sub>) dendritic cells with dimethylfumarate. *Journal of dermatological science*. 2017;87(3):278-84.
67. West J, Ogston S, Berg J, Palmer C, Fleming C, Kumar V, et al. HLA-Cw6-positive patients with psoriasis show improved response to methotrexate treatment. *Clinical and experimental dermatology*. 2017;42(6):651-5.
68. Lucka T, Pathirana D, Sammain A, Bachmann F, Rosumeck S, Erdmann R, et al. Efficacy of systemic therapies for moderate-to-severe psoriasis: a systematic review and meta-analysis of long-term treatment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2012;26(11):1331-44.
69. Thaçi D, Blauvelt A, Reich K, Tsai T-F, Vanaclocha F, Kingo K, et al. Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate to severe plaque psoriasis: CLEAR, a randomized controlled trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2015;73(3):400-9.
70. Blauvelt A, Reich K, Tsai T-F, Tyring S, Vanaclocha F, Kingo K, et al. Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate-to-severe plaque psoriasis up to 1 year: results from the CLEAR study. *Journal of the american academy of dermatology*. 2017;76(1):60-9. e9.
71. Zweegers J, Groenewoud J, van den Reek J, Otero M, van de Kerkhof P, Driessen R, et al. Comparison of the one and 5-years effectiveness of adalimumab, etanercept and ustekinumab in patients with psoriasis in daily clinical practice. Different perspectives on psoriasis care with biologics. 2017;176(4):73.
72. Hsu L, Armstrong AW. Anti-drug antibodies in psoriasis: a critical evaluation of clinical significance and impact on treatment response. *Expert review of clinical immunology*. 2013;9(10):949-58.
73. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology*. 2015;33:257-90.
74. Bedoui S, Gebhardt T, Gasteiger G, Kastenmüller W. Parallels and differences between innate and adaptive lymphocytes. *Nature immunology*. 2016;17(5):490-4.
75. Laurence J. T-cell subsets in health, infectious disease, and idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. *Annals of internal medicine*. 1993;119(1):55-62.
76. den Haan JM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology letters*. 2014;162(2):103-12.
77. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*. 2015;16(4):343-53.
78. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449(7161):419-26.
79. Förster R, Braun A, Worbs T. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends in immunology*. 2012;33(6):271-80.
80. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*. 2018;48(2):202-13.
81. Van Laethem F, Tikhonova AN, Singer A. MHC restriction is imposed on a diverse T cell receptor repertoire by CD4 and CD8 co-receptors during thymic selection. *Trends in immunology*. 2012;33(9):437-41.

82. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:261-92.
83. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *Apmis.* 2003;111(7-8):675-97.
84. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515-48.
85. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology.* 2003;3(12):984-93.
86. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7–CD28 superfamily. *Nature Reviews Immunology.* 2002;2(2):116-26.
87. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature Reviews Immunology.* 2003;3(12):939-51.
88. Gaffen SL. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine.* 2001;14(2):63-77.
89. Zhou X-Y, Yashiro-Ohtani Y, Nakahira M, Park WR, Abe R, Hamaoka T, et al. Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *The Journal of Immunology.* 2002;168(8):3847-54.
90. Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual review of immunology.* 2002;20(1):29-53.
91. Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes and infection.* 2004;6(8):759-66.
92. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995;3(5):541-7.
93. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science.* 1995;270(5238):985-8.
94. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *The Journal of Immunology.* 2002;169(10):5538-45.
95. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *The Journal of Immunology.* 2004;173(2):945-54.
96. Nishimura H, Honjo T, Minato N. Facilitation of  $\beta$  selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1–deficient mice. *The Journal of experimental medicine.* 2000;191(5):891-8.
97. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology.* 2005;6(3):280-6.
98. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999;11(2):141-51.
99. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine.* 2006;203(4):883-95.
100. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology.* 2009;28:445-89.
101. Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2013;13(11):777-89.
102. Zheng W-p, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 1997;89(4):587-96.
103. Zhang D-H, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(34):21597-603.
104. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology.* 2002;2(12):933-44.

105. Medoff BD, Thomas SY, Luster AD. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:205-32.
106. Grogan JL, Locksley RM. T helper cell differentiation: on again, off again. *Current opinion in immunology.* 2002;14(3):366-72.
107. O'garra A, Gabryšová L, Spits H. Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells. *Nature immunology.* 2011;12(4):288-94.
108. DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. *Nature Reviews Immunology.* 2016;16(3):149-63.
109. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:741-66.
110. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science.* 2010;327(5969):1098-102.
111. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology.* 2005;5(10):772-82.
112. Anderson G, Moore NC, Owen JJ, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. *Annual review of immunology.* 1996;14(1):73-99.
113. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4+ CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *Journal of Experimental Medicine.* 2001;193(11):1303-10.
114. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970;18(5):723.
115. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology.* 1995;155(3):1151-64.
116. Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *Journal of allergy and clinical immunology.* 2005;116(5):949-59.
117. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+ CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology.* 2001;167(3):1245-53.
118. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo M-G. Human CD25+ CD4+ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *Journal of Experimental Medicine.* 2001;193(11):1295-302.
119. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology.* 2003;4(4):330-6.
120. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova J-L, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics.* 2001;27(1):18-20.
121. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International immunology.* 2007;19(4):345-54.
122. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scandinavian journal of immunology.* 2009;70(4):326-36.
123. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature.* 2007;445(7129):766-70.
124. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Heßling S, Palmethofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine.* 2007;204(6):1303-10.
125. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+ CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine.* 2000;192(2):295-302.
126. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology.* 2003;4(12):1206-12.



127. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(10):762-74.
128. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(6):1257-65.
129. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *The Journal of Immunology*. 2006;177(10):6780-6.
130. Bacher N, Raker V, Hofmann C, Graulich E, Schwenk M, Baumgrass R, et al. Interferon- $\alpha$  suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. *Cancer research*. 2013;73(18):5647-56.
131. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4<sup>+</sup> memory T cells: functional modules for tailored immunity. *European journal of immunology*. 2009;39(8):2076-82.
132. Pandya JM, Lundell AC, Hallström M, Andersson K, Nordström I, Rudin A. Circulating T helper and T regulatory subsets in untreated early rheumatoid arthritis and healthy control subjects. *Journal of leukocyte biology*. 2016;100(4):823-33.
133. Gosselin A, Monteiro P, Chomont N, Diaz-Griffero F, Said EA, Fonseca S, et al. Peripheral blood CCR4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> and CXCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *The Journal of Immunology*. 2010;184(3):1604-16.
134. Wacleche VS, Goulet J-P, Gosselin A, Monteiro P, Soudeyns H, Fromentin R, et al. New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology*. 2016;13(1):1-25.
135. Zhong W, Jiang Y, Ma H, Wu J, Jiang Z, Zhao L. Elevated levels of CCR6<sup>+</sup> T helper 22 cells correlate with skin and renal impairment in systemic lupus erythematosus. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-11.
136. Jesús-Gil D, Ruiz-Romeu E, Ferran M, Chiriac A, Deza G, Hólo P, et al. CLA<sup>+</sup> T cell response to microbes in psoriasis. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1488.
137. Thomas ML. The leukocyte common antigen family. *Annual review of immunology*. 1989;7(1):339-69.
138. Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters*. 2018;196:22-32.
139. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2018;131(1):58-67.
140. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*. 1996;4(6):535-43.
141. Luan L, Han S, Wang H, Liu X. Down-regulation of the Th1, Th17, and Th22 pathways due to anti-TNF- $\alpha$  treatment in psoriasis. *International immunopharmacology*. 2015;29(2):278-84.
142. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology*. 2007;8(6):639-46.
143. Benham H, Norris P, Goodall J, Wechalekar MD, FitzGerald O, Szentpetery A, et al. Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(5):1-11.
144. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3573-85.
145. Piaserico S, Sandini E, Saldan A, Abate D. Effects of TNF-Alpha Inhibitors on Circulating T h17 Cells in Patients Affected by Severe Psoriasis. *Drug development research*. 2014;75:S73-S6.
146. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010;130(5):1373-83.
147. Langewouters A, Van Erp P, De Jong E, Van De Kerkhof P. Lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with moderate-to-severe versus mild plaque psoriasis. *Archives of dermatological research*. 2008;300:107-13.

148. Jókai H, Szakonyi J, Kontár O, Barna G, Inotai D, Kárpáti S, et al. Cutaneous lymphocyte-associated antigen as a novel predictive marker of TNF-alpha inhibitor biological therapy in psoriasis. *Experimental dermatology*. 2013;22(3):221-3.
149. Pont-Giralt M, Giménez-Arnau AM, Pujol RM, Santamaria-Babi LF. Circulating CLA (+) T cells from acute and chronic psoriasis patients manifest a different activation state and correlation with disease severity and extension. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(1):227-8.
150. Eysteinsdóttir J, Sigurgeirsson B, Olafsson J, Fridriksson T, Agnarsson B, Davíðsson S, et al. The role of Th17/Tc17 peripheral blood T cells in psoriasis and their positive therapeutic response. *Scandinavian journal of immunology*. 2013;78(6):529-37.
151. Zhang Z, Yu Z, Tian P, Hou S, Han S, Tan X, et al. Differentially-expressed genes identified by suppression subtractive hybridization in the bone marrow hematopoietic stem cells of patients with psoriasis. *Molecular Medicine Reports*. 2014;10(1):479-85.
152. Furue M, Furue K, Tsuji G, Nakahara T. Interleukin-17A and keratinocytes in psoriasis. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(4):1275.
153. Lee JS, Lee W-W, Kim SH, Kang Y, Lee N, Shin MS, et al. Age-associated alteration in naive and memory Th17 cell response in humans. *Clinical Immunology*. 2011;140(1):84-91.
154. Dudda JC, Perdue N, Bachtanian E, Campbell DJ. Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(7):1559-65.
155. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology*. 2012;3:51.
156. Zhang L, Li Y, Yang X, Wei J, Zhou S, Zhao Z, et al. Characterization of Th17 and FoxP3+ Treg cells in paediatric psoriasis patients. *Scandinavian journal of immunology*. 2016;83(3):174-80.
157. Zhang L, Yang X-Q, Cheng J, Hui R-S, Gao T-W. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3+ Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clinical immunology*. 2010;135(1):108-17.
158. Pawlaczek M, Karczewski J, Wiktorowicz K. T regulatory CD4+ CD25high lymphocytes in peripheral blood of patients suffering from psoriasis. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*. 2010;27(1):25-8.
159. Karamehic J, Zecevic L, Resic H, Jukic M, Jukic T, Ridjic O, et al. Immunophenotype lymphocyte of peripheral blood in patients with psoriasis. *Medical Archives*. 2014;68(4):236.
160. Bovenschen HJ, Van De Kerkhof PC, Van Erp PE, Woestenenk R, Joosten I, Koenen HJ. Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011;131(9):1853-60.
161. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+ CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *The Journal of Immunology*. 2005;174(1):164-73.
162. Qin W, Hu L, Zhang X, Jiang S, Li J, Zhang Z, et al. The diverse function of PD-1/PD-L pathway beyond cancer. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2298.
163. De Bock M, Hulstaert E, Kruse V, Brochez L. Psoriasis vulgaris exacerbation during treatment with a PD-1 checkpoint inhibitor: case report and literature review. *Case reports in dermatology*. 2018;10(2):190-7.
164. Peled M, Strazza M, Azoulay-Alfaguter I, Mor A. Analysis of programmed death-1 in patients with psoriatic arthritis. *Inflammation*. 2015;38(4):1573-9.
165. Rodriguez RS, Pauli ML, Neuhaus IM, Siegrid SY, Arron ST, Harris HW, et al. Memory regulatory T cells reside in human skin. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(3):1027-36.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

ADA	Anti-Drug-Antikörper
Bcl-6	B-cell Lymphoma 6 Protein
Bzw	beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CLA	Cutaneous lymphocyte-associated antigen
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CXCR3	C-X-C Motif Chemokine Receptor 3
DAMP	Damage-associated Molecular Pattern
DC	Dendritic Cell
Et al.	Et aliae
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Foxp3	Forkhead Box P3
GATA3	GATA binding protein 3
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
MCH	Major Histocompatibility Complex
MTX	Metothrexat
NLR	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PSORS	Psoriasis Susceptibility
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	Toll Like Receptor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle

i T<sub>reg</sub>

Induzierte regulatorische T-Zelle

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Pathogenese
Abbildung 2	T-Zelldifferenzierung
Abbildung 3	Versuchsaufbau
Abbildung 4	Isolation der PBMC
Abbildung 5	Charakterisierung der T-Zell-Subpopulationen
Abbildung 6	T-Effektorzellen
Abbildung 7	T <sub>h</sub> 22-Zellen
Abbildung 8	CD45RA/RO
Abbildung 9	Expression des Skin-Homing-Rezeptors CLA
Abbildung 10	Eingrenzungsstrategie der regulatorischen T-Zellen
Abbildung 11	Weitere Differenzierung der Tregs
Abbildung 12	CTLA-4
Abbildung 13	PD-1
Abbildung 14	Zusammensetzung der CD3 <sup>+</sup> Zellen
Abbildung 15	Anteil CD4 <sup>+</sup> Zellen
Abbildung 16	CLA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Zellen
Abbildung 17	PASI-Korrelation
Abbildung 18	T <sub>h</sub> 1- und T <sub>h</sub> 17-Zellen
Abbildung 19	T <sub>h</sub> 2-Zellen
Abbildung 20	T <sub>h</sub> 17-Zellen
Abbildung 21	Regulatorische T-Zellen
Abbildung 22	Korrelationen T <sub>h</sub> 1-Zellen zu regulatorischen T-Zellen
Abbildung 23	Korrelation T <sub>h</sub> 17-Zellen zu regulatorischen T-Zellen
Abbildung 24	CLA <sup>+</sup> T <sub>h</sub> 1-Zellen
Abbildung 25	CLA <sup>+</sup> T <sub>h</sub> 2-Zellen
Abbildung 26	CLA <sup>+</sup> T <sub>h</sub> 17-Zellen
Abbildung 27	PASI-Korrelation T-Effektorzellen
Abbildung 28	PASI-Korrelation CLA <sup>+</sup> T-Effektorzellen

Abbildung 29	Gating aktive T-Effektorzellen
Abbildung 30	Aktive T-Effektorzellen (CD25 <sup>high</sup> )
Abbildung 31	CD45RO/RA CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
Abbildung 32	Gating für CD45RA und CD45RO
Abbildung 33	CD45RA und CD45RO
Abbildung 34	Vergleich zwischen Gruppen der CD45RA/RO-positiven Zellen
Abbildung 35	CTLA-4 <sup>+</sup> und PD-1 <sup>+</sup> Tregs
Abbildung 36	CTLA-4 <sup>+</sup> und PD-1 <sup>+</sup> T-Zellen in CD25 <sup>-</sup> T-Zellen