

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Christoph Härtel

Einfluss von IL-17 auf die Stabilität und Funktion von regulatorischen T-Zellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Robert Woidich

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2023

Referentin: Prof. Dr. Martina Prelog
Korreferent: Prof. Dr. Matthias Goebeler
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2024

Der Promovend ist Arzt

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation „Einfluss von IL-17 auf die Stabilität und Funktion von regulatorischen T-Zellen“ eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde.

Würzburg, den 07.10.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das erworbene Immunsystem.....	1
1.1.1	T-Zell Differenzierung.....	1
1.1.1	T-Zell Subpopulationen	3
1.1.2	Th-Zell Subpopulationen	4
1.1.3	Regulatorische T-Zellen (Tregs).....	6
1.1.3.1	Immunsuppressive Funktion von Tregs	8
1.1.3.2	FoxP3-Expression.....	9
1.1.4	Th17 Zellen	11
1.1.5	IL-17	12
1.1.6	T-Zell Plastizität.....	13
1.1.6.1	Th17 Plastizität.....	13
1.1.6.2	Treg-Plastizität	14
1.2	Psoriasis	16
1.2.1	Epidemiologie.....	16
1.2.2	Ätiopathogenese	16
1.2.3	Klinik.....	17
1.2.4	Therapieregime	19
	Zielsetzung und Rationale.....	21
2	Material und Methoden.....	23
1.1	Material.....	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Puffer und Medien	27
2.1.4	Gebrauchsfertige Lösungen	28
2.1.5	Gebrauchsfertige Kits.....	28
2.1.6	Stimulationen und Hemmstoffe	29
2.1.7	Antikörper	30
2.1.8	Chemikalien und Gase.....	32

2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Probanden.....	33
2.2.1.1	Studienpopulation	33
2.2.2	Lymphozytenisolierung mittels Dichtezentrifugation	33
2.2.3	Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer	35
2.2.4	Kryokonservierung	35
2.2.5	Durchflusszytometrie.....	36
2.2.6	Extrazelluläre Fluoreszenzfärbung.....	37
2.2.7	Intrazelluläre Fluoreszenzfärbung	38
2.2.8	Treg-Zellkultur und Stimulationsexperimente.....	40
2.2.8.1	Magnetische Zellseparation (MACS)	40
2.2.8.2	Proliferationsmessung mittels CFSE.....	42
2.2.8.3	In vitro Kultur der Treg-Zellen	43
2.2.8.4	Suppressionsversuch mit Tregs.....	44
2.2.8.5	Suppressionsversuch mit Tregs und gleichzeitig Secukinumab	45
2.2.8.6	Suppressionsversuch mit Th17-stimulierten Tregs	45
2.2.9	Statistik.....	46
3	Ergebnisse	48
3.1	Vergleich der T-Zellen von Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC).....	48
3.1.1	Daten der gesamten Studienpopulation	48
3.1.2	Studienpopulation der Spender von unstimulierten PBMCs	52
3.1.3	Prozentuale Verteilung der Lymphozyten	54
3.1.3.1	Oberflächenmarker CCR6, CXCR3 und CCR7.....	55
3.1.3.2	Produktion von GranzymB und Perforin.....	56
3.1.4	Expression von Chemokinrezeptoren	59
3.1.5	Intrazelluläre Zytokinproduktion	61
3.1.6	Charakterisierung der Tregs.....	63
3.1.6.1	Charakteristika der Tregs (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻)	63
3.1.6.2	Charakteristika der CD4 ⁺ CCR6 ⁺ -T-Zellen.....	63
3.1.6.3	Charakteristika der Treg/Th17-Zellen	65
3.1.7	Charakterisierung der Tregs nach Stimulation	67

3.1.7.1 Kollektiv der PSO und HC bei Treg-Charakterisierung	67
3.1.7.2 CCR6 und FoxP3 Expression nach Stimulation bei HC.....	68
3.1.7.3 IL-17 Expression nach Stimulation bei HC.....	70
3.1.7.4 IFN γ Expression nach Stimulation bei HC.....	72
3.1.7.5 CCR6 und FoxP3 Expression nach Stimulation bei PSO	74
3.1.7.6 IL-17 Expression nach Stimulation bei PSO	76
3.1.7.7 IFN γ Expression nach Stimulation bei PSO	77
3.1.7.8 Vergleich der Treg-Charakterisierung zwischen HC und PSO ..	79
3.2 Suppressionsfähigkeit der Tregs bei PSO und HC	87
3.2.1 Kollektiv der PSO und HC des Suppressionsversuchs	87
3.2.2 Reinheit der Tregs nach MACS.....	88
3.2.3 Ergebnisse Suppressionsversuch in HC	90
3.2.3.1 Proliferation der PBMCs in HC.....	90
3.2.3.2 Inhibition der Tregs in HC	90
3.2.4 Ergebnisse Suppressionsversuch in PSO.....	93
3.2.4.1 Proliferation der PBMCs in PSO	93
3.2.4.2 Inhibition der Tregs in PSO	93
3.2.5 Ergebnisse des Suppressionsversuchs im Vergleich zwischen PSO und HC	95
3.2.5.1 Proliferation der PBMCs vergleichend PSO und HC	95
3.2.5.2 Inhibition der PBMCs vergleichend bei Patienten und Kontrollen	96
3.3 Suppressionsversuch unter proinflammatorischem Milieu und Secukinumab.....	99
3.3.1 Demografische Daten der Kohorte.....	99
3.3.2 Proliferation der PBMCs.....	99
3.3.3 Suppression der Tregs mit und ohne Secukinumab	100
3.4 Treg-Stimulationsversuch.....	102
3.4.1 Demografische Daten der Kohorte.....	102
3.4.2 Proliferation der PBMCs.....	102
3.4.3 Inhibition der PBMCs durch unterschiedliche Tregs	103
4 Diskussion.....	106

4.1	Interpretation der Unterschiede im Lymphozytenpool von PSO und HC	106
4.1.1	Unterschiede der Chemokinrezeptoren und T-Zellsubpopulationen	106
4.1.2	Unterschiede der Zytotoxizität	109
4.1.3	Unterschied in der Zytokinexpression	110
4.1.4	Verteilung von Th1/Th17-Zellen	111
4.1.5	Unterschied Anzahl und des Phänotyps der Tregs	112
4.1.6	Unterschied in der Treg/Th-17 Plastizität	113
4.2	Charakterisierung der Tregs unter verschiedenen Stimulationen	115
4.2.1	Einfluss der Stimulation auf die Oberflächenmarker	115
4.2.2	Einfluss der Stimulation auf die Zytokine	117
4.3	Einfluss der Stimulationen auf die Suppressionsfähigkeit der Tregs	120
4.3.1	Suppressionsversuch	120
4.3.2	Tregs und Secukinumab koadministriert	123
4.3.3	Suppressionsfähigkeit von Tregs nach vorheriger Kultivierung	124
4.4	Technische Limitationen	125
4.4.1	Limitationen innerhalb der Kohorten	125
4.4.2	Methodenabhängige Limitationen	125
4.5	Konklusion	127
4.6	Ausblick	129
5	Zusammenfassung	130
6	Literaturverzeichnis	132
7	Anhang	139
7.1	Eigenleistung	189
7.2	Danksagung	189
	Appendix	190
I	Abkürzungsverzeichnis	190
II	Abbildungsverzeichnis	192
III	Tabellenverzeichnis	194

IV	Lebenslauf.....	196
V	Veröffentlichung und Kongressteilnahmen	197

1 Einleitung

1.1 Das erworbene Immunsystem

Das biologische Abwehrsystem von höheren Lebewesen bezeichnet man als Immunsystem, welches von dem lateinischen Wort immunis (=frei, rein) stammt. Nicht nur für den Menschen, sondern für alle Organismen ist ein funktionierendes Immunsystem entscheidend für das Überleben der Spezies. Dabei hat es die Aufgabe, Feinde von außen wie Bakterien, Pilze oder Parasiten abzuwehren. Auch eigene Zellen, die ihre Funktion verloren haben, müssen vom Immunsystem erkannt und zerstört werden [1].

Zwar besitzen alle Lebewesen ein Schutzsystem für Einflüsse von außen und innen, allerdings unterscheidet sich dieses stark in ihrer Effektivität.

Bereits früh in der Stammesgeschichte entwickelte sich die angeborene Immunabwehr, die hauptsächlich aus phagozytierenden Zellen, physiologischen Barrieren und einfachen Entzündungsreaktionen besteht, und sich daher nicht an bestimmte Erreger anpassen kann.

Im Vergleich dazu entwickelte sich bei Wirbeltieren eine zusätzliche, komplexere adaptive Immunabwehr, die sich selbst im Laufe des Lebens verändert, an neue Situationen anpasst und ein immunologisches Gedächtnis aufbaut, welches die Arbeit gegen Krankheitserreger deutlich effektiver macht. Die wichtigsten Zellen dafür sind neben den antigenpräsentierenden Zellen und B-Lymphozyten die T-Lymphozyten, die mittels spezifischer Antigene dazu in der Lage sind Feinde zu erkennen und zu eliminieren [2].

1.1.1 T-Zell Differenzierung

Die T-Lymphozyten als Teil der adaptiven Immunabwehr werden aus Stammzellen im Knochenmark gebildet und reifen anschließend als Vorläuferzellen im Thymus heran. Im Rahmen der Reifung der Zellen exprimieren diese Proteine wie Cluster of Differentiation 3 (CD3), sowie CD4 und CD8 auf der Zelloberfläche, welche als Korezeptoren anschließend an unterschiedliche Major

histocompatibility complex Moleküle (MHC-Moleküle) binden, um mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) in Kontakt zu treten [1].

Die Möglichkeit der Erkennung einer Vielzahl verschiedener Antigene entsteht durch somatische Desoxyribonukleinsäure Rekombination (DNA-Rekombination), bei welcher Gensegmente bei der Entstehung eines Lymphozyten neu gebildet werden, und somit unterschiedliche Rezeptoren entstehen. Durch den Mechanismus der positiven und negativen Selektion reifen die T-Zellen, welche Peptid- und MHC-Komplexe erkennen, aus und beenden die Expression von CD4 oder CD8. Zellen, die auf Autoantigene ansprechen, werden durch Apoptose aussortiert, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden. Auf diese Weise entstehen im Thymus einfach CD8⁺-T-Zellen, die als zytotoxische Zellen den MHC-I Rezeptor erkennen, der auf allen Körperzellen vorhanden ist, und infizierte Zellen zerstören können. Dies ist insbesondere bei der Bekämpfung von Viren wichtig. Daneben entstehen CD4⁺-T-Zellen, die den MHC-II Rezeptor erkennen, der auf antigenpräsentierenden Zellen vorhanden ist, und somit Zellfragmente nach der Phagozytose präsentiert bekommen[3].

Als Untergruppe der CD4⁺-T-Zellen gehen aus dem Thymus außerdem regulatorische T-Zellen (Tregs) hervor. Diese bilden während ihrer Reifung unter Stimulation des Interleukin-2-Rezeptors (IL-2R) Forkhead-Box-Protein 3 (FoxP3) zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz. Nach vollständiger Ausreifung der T-Zellen werden sie in die Peripherie ausgeschüttet und zirkulieren zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen [4].

Der Chemokinrezeptor 7 (CCR7-Rezeptor) auf Lymphozyten und dendritischen Zellen erkennt den Chemokin-Liganden 19 (CCL-19), welcher als Chemokin von Endothelzellen im Lymphknoten gebildet wird. Dendritische Zellen selbst erzeugen CCL-21, um die Chemokin-Wirkung zu verstärken. Die Wanderung in den Lymphknoten erfolgt durch Selektine (CD62) und Adressine (CD34), welche ein „Rolling“ ermöglichen. Die anschließende Überwindung der Barriere wird durch Integrine gewährleistet, sodass die Lymphozyten in die Lymphknoten gelangen, um dort mit Antigenen in Kontakt treten zu können. Über CD69 und Sphingosin-1-Phosphatrezeptor 1 (S1PR1) werden die Zellen für eine gewisse Zeit im Lymphknoten gehalten, bis sie anschließend wieder in den Blutstrom

gelangen. Diese Wanderung der Lymphozyten zwischen dem Blut und sekundär lymphatischem Gewebe geschieht kontinuierlich. Bei Erkennung eines passenden Antigens verbleibt die T-Zelle im Lymphknoten und durchläuft eine klonale Expansion. Es entstehen hierbei T-Effektorzellen und T-Gedächtniszellen [1].

1.1.1 T-Zell Subpopulationen

Naive T-Zellen werden charakterisiert durch die Expression von CD45RA, als Korezeptor für die Bindung und Erkennung von Antigenen. Bei CD45 handelt es sich um eine Tyrosinkinase. Nach Aktivierung und Proliferation der naiven T-Zellen kommt es zur Differenzierung von T-Effektorzellen, welche die sofortige Immunabwehr darstellen und anschließend durch Apoptose zugrunde gehen. Diese Effektorzellen sind unter anderem durch Veränderung des Splicings der Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) des CD45-Rezeptors zur Isoform CD45RO charakterisiert, welche eine schnellere Stimulation der T-Zelle durch Antigene bewirkt [5].

CD27 ist ein kostimulierender Rezeptor aus der Familie der Tumornekrosefaktor Rezeptoren (TNF-Rezeptoren), der für die Aktivierung von naiven T-Zellen notwendig ist. Effektorzellen verlieren den Rezeptor durch wiederholte Stimulation [6].

Nach dem Untergang der Effektorzellen bleibt eine Untergruppe der Aktivierungskaskade als T-Gedächtniszellen bestehen. Diese Zellen sind durch den Verlust von CD45RA und das Vorhandensein von CD27 gekennzeichnet. Die Aufgabe der Zellen liegt darin, bei erneutem Antigenkontakt schnell reaktiviert werden zu können, um eine erneute Immunreaktion auszulösen. Hierfür sind die Zellen deutlich empfindlicher bei der Antigenpräsentation im Vergleich zur naiven T-Zelle und produzieren nach Aktivierung zusätzlich proinflammatorische Zytokine wie Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$), $\text{TNF}\alpha$ und Interleukin 2 (IL-2) [1].

Eine weitere Untergruppe der T-Gedächtniszellen stellt die Gruppe der Terminalen Effektor-Memory-Zellen (TEMRA) dar. Diese Zellen exprimieren den CD45RA-Rezeptor, wie er auch auf naiven T-Zellen zu finden ist. Zudem werden

sie durch einen Verlust von CD27 charakterisiert. Sie spielen bei humanpathogenen Viren wie Dengue und Zytomegalievirus (CMV) eine Rolle, wobei die genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt ist [5].

Eine Grafik über die Verteilung der Subpopulationen in Abhängigkeit der Oberflächenmarker ist in Abbildung 1 dargestellt.

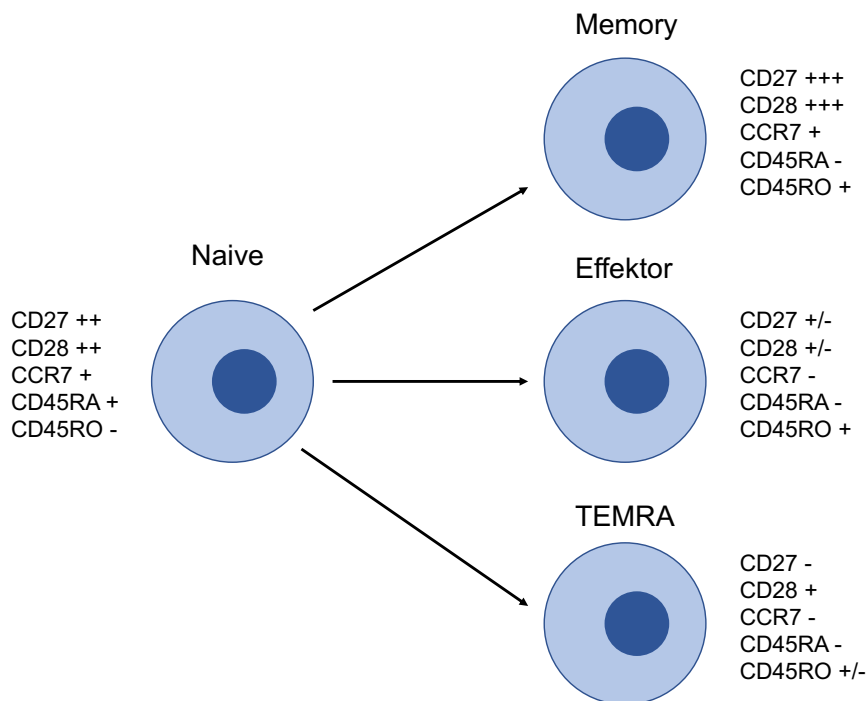


Abbildung 1: Subpopulationen der T-Zellen mit Oberflächenmolekülen.

In unserer Arbeit erfolgt die Unterscheidung zwischen den 4 verschiedenen Subpopulationen über die Expression von CD27 und CD45RA. Die Entwicklung der Memory-, Effektor-, und TEMRA-Zellen erfolgt aus naiven Zellen. Die Veränderung der Oberflächenmarker wird neben der Zelle gezeigt (modifiziert nach [7]).

1.1.2 Th-Zell Subpopulationen

Die CD4⁺-T-Helferzellen (Th-Zellen) entwickeln sich aus naiven CD4⁺-T-Zellen. Bei Bindung an eine antigenpräsentierende Zelle über das Leukozyten Funktions-Antigen 1 (LFA-1) und CD2-Rezeptoren auf der T-Zelle werden über MHC-II-Moleküle die Antigene präsentiert. Bei Erkennung eines passenden Antigens verstärkt sich die Bindung zwischen der naiven T-Zelle und der APC. Durch kostimulierende Signale und Zytokine beginnt das Priming der naiven

T-Zelle. Insbesondere B7-Moleküle auf der APC stimulieren die T-Zellen über den CD28-Rezeptor. Die T-Zellen treten nun in den Zellzyklus ein und proliferieren. Sie beginnen, IL-2 als Stabilisationsfaktor zu bilden und CD25 als Teil des IL-2-Rezeptors zu transkribieren. Die T-Zellen wandeln sich nun von naiven T-Zellen in verschiedene Subpopulationen um. Dies geschieht in Abhängigkeit der Präsenz verschiedener Zytokine während des Primings durch Stimulation unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren der Signal transducers and activators of transcription (STAT)-Familie, wie in Abbildung 2 gezeigt [1].

Th1-Zellen sind gekennzeichnet durch die Produktion von $\text{IFN}\gamma$. Diese Zellen werden stimuliert durch IL-12 und $\text{IFN}\gamma$, welches v.a. durch Makrophagen gebildet wird. Somit unterstützen sie die Zerstörung von Überresten, welche nach Zerstörung durch Makrophagen übriggeblieben sind. Beispiele hierfür sind intrazelluläre Bakterien, Viren oder Protozoen.

Th2-Zellen spielen insbesondere bei der Abwehr extrazellulärer Parasiten eine Rolle. Sie unterstützen die Abwehr eosinophiler Zellen und Immunglobulin E (IgE) Antikörper, indem sie determiniert durch IL-4 selbst IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren und damit den Isotypenwechsel von B-Zellen zu IgE stimulieren.

Th17-Zellen werden insbesondere durch extrazelluläre Bakterien stimuliert und produzieren IL-17 sowie IL-22. Dabei stimulieren sie B-Zellen sowie Epithelzellen zur Produktion antimikrobieller Peptide. Auf Th17-Zellen wird in einem Extrakapitel noch genauer eingegangen [2]. In Abbildung 2 wird die Entwicklung der einzelnen Subpopulationen in Abhängigkeit der Zytokine dargestellt.

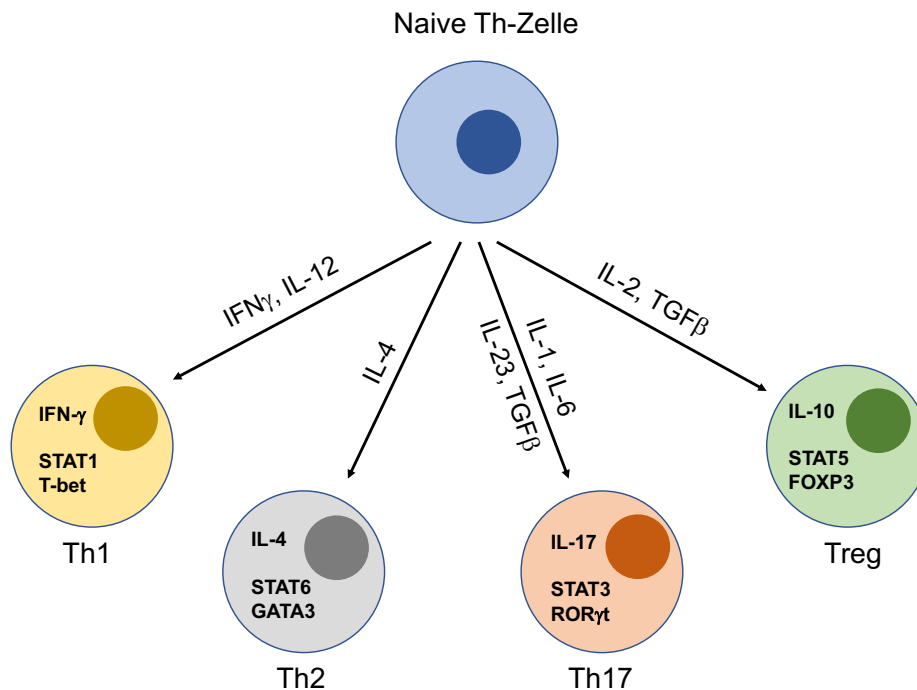


Abbildung 2: Differenzierung unterschiedlicher Th-Zell Subpopulationen.

In der Grafik finden sich 4 Hauptpopulationen von Th-Zellen. Über den Pfeilen werden die Zytokine dargestellt, unter welchen eine Differenzierung in die jeweilige Subpopulation stattfindet. Innerhalb der Zellen findet sich oberhalb das Hauptzytokin, welches die Th-Zelle produziert und unterhalb die aktivierten Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach [8]).

1.1.3 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Regulatorische T-Zellen erfüllen die Aufgabe, im Körper eine Toleranz gegen Autoantigene zu erhalten und damit Autoimmunkrankheiten zu verhindern. Bereits in den 1970er Jahren wurde erstmals die Notwendigkeit von T-Zellen für die Selbsttoleranz des Immunsystems beschrieben [9]. Im weiteren Verlauf konnten die Zellen als CD4⁺CD25⁺-T-Zellen charakterisiert werden [10, 11].

Tregs entstehen im Thymus als natürliche Tregs (nTreg oder tTregs), aber auch aus naiven CD4⁺-T-Zellen, den induzierten und peripheren Tregs (iTregs und pTregs). Die unterschiedliche Entwicklung wird in Abbildung 3 grafisch gezeigt.

nTregs entwickeln sich aus CD4⁺CD8⁺-Thymozyten mit hoher Affinität zu Selbst-MHC:Selbst-Peptid-Komplexen. Die Bindung aktivierter dendritischer Zellen unter Kostimulation führt zu einer Expression von CD25⁺-T-Zellen [12].

Unter dem Einfluss von IL-2 und IL-15, welches unter anderem durch

Makrophagen und B-Zellen gebildet wird, kommt es zu einer Differenzierung in FoxP3⁺ nTregs [13].

iTregs entwickeln sich aus CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation in Anwesenheit von Transforming Growth Factor- β (TGF- β), IL-2 und Abwesenheit von IL-6 und anderer proinflammatorischer Zytokine. In einem Mausmodell konnte eine verminderte Anzahl von iTregs im Vergleich zu nTregs bei TGF- β 1-defizienten Mäusen nachgewiesen werden [14]. Die Treg Entwicklung geschieht in sekundär lymphatischem Gewebe und dient dazu, eine Immunantwort auf eine kommensale Mikroflora wie beispielsweise im Darm zu verhindern. Neben dem reichlichen Vorkommen von TGF- β im Intestinum führen Retinsäure und dendritische Zellen über die conserved noncoding sequence 1 (CNS-1) Genregion zu einer weiteren Induktion von iTregs [15]. Die Entwicklung der unterschiedlichen Tregs wird zusammenfassend in Abbildung 3 dargestellt.

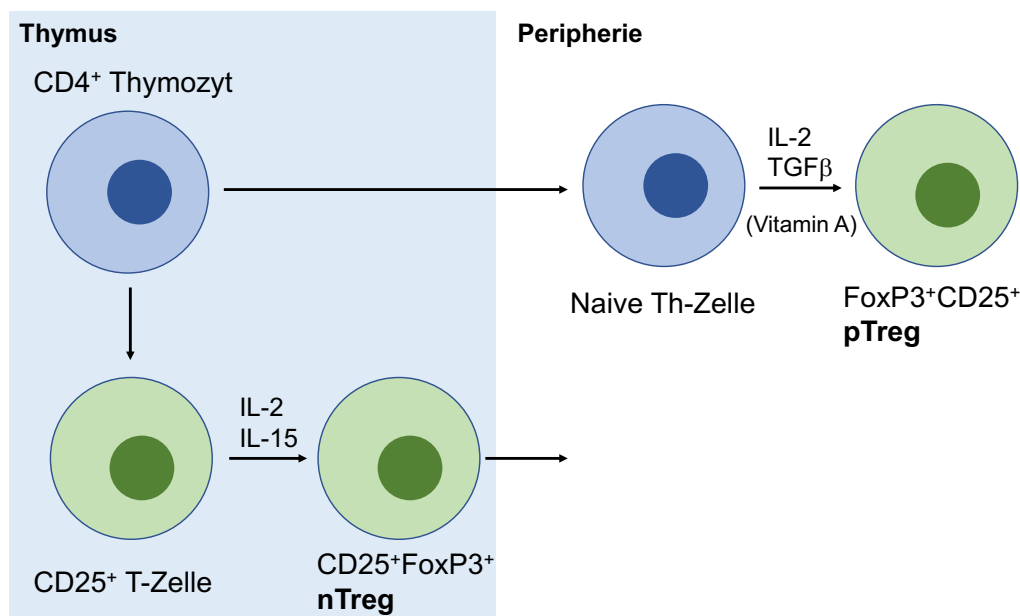


Abbildung 3: Entwicklung von nTregs und pTregs.

Die Entwicklung der nTregs entsteht im Thymus durch Thymozyten mit hoher Affinität zu Selbst-MHC:Selbst-Peptid-Komplexen. Durch Bindung dendritischer Zellen kommt es zur Expression von CD25 und unter Stimulation durch IL-2 und IL-15 zur Transkription von FoxP3. Auch in der Peripherie können Tregs entstehen, sogenannte pTregs. Hierbei erfolgt die Stimulation von naiven Th-Zellen durch IL-2, TGF- β und Retinsäure (Vitamin A) unter Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine (modifiziert nach [16]).

Im Unterschied zu nTregs sind iTregs instabiler. Die Stabilität von nTregs wird durch die Demethylierung von CpG-Inseln in der CNS-2-Region des FoxP3 Gens der Treg-spezifischen demethylierten Region (TSDR) gewährleistet, auf welche im späteren Kapitel noch weiter eingegangen wird. Im Gegensatz dazu ist diese Region bei iTregs methyliert und führt hierdurch zu einer instabilen Expression von FoxP3 [17]. IL-2 konnte in einer Studie die Demethylierung der CNS-2-Region fördern und somit die Foxp3-Expression stabilisieren [18].

1.1.3.1 Immunsuppressive Funktion von Tregs

Sowohl nTregs als auch iTregs besitzen den Transkriptionsfaktor FoxP3 zur Aufrechterhaltung einer immunologischen Selbsttoleranz.

Sie tragen auf ihrer Zelloberfläche das cytotoxic t-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4), welcher mit dem B7-Liganden der APC als kostimulierenden Faktor konkurriert, und damit die Proliferation von naiven T-Zellen hemmt, sowie CD25 als Rezeptor für IL-2, um in den IL-2 abhängigen Prozess des Primings hemmend eingreifen zu können. Charakterisiert sind sie außerdem durch die Produktion von Zytokinen wie IL-10, IL-35 und TGF- β .

IL-10 wirkt hierbei über die Hemmung von proinflammatorischen Zytokinen, welche durch APC ausgeschüttet werden. So kann eine Inhibition von IL-12 und IL-23 durch IL-10 zu einer Destabilisierung und verminderten Differenzierung von Th1- und Th17-Zellen führen [1]. In Mausexperimenten konnte bei einer Deletion des IL-10 Gens eine deutlich erhöhte Rate an entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt werden [19].

IL-35 konnte als Zytokin, welches durch Tregs exprimiert wird und eine immunsuppressive Wirkung zeigt, identifiziert werden. Bei Inhibition von IL-35 konnte in vitro eine reduzierte regulatorische Aktivität nachgewiesen werden [20]. TGF- β kann direkt durch Zell-Zell-Kontakt immunsuppressiv wirken und die Entstehung von iTregs fördern [21].

Neben der Suppression durch Zytokine können Tregs ihre Funktion mittels Zytolyse durch die Sekretion von Granzymen ausführen. Dabei können Zellen durch Granzym und Perforin bei Bindung an CD18 direkt getötet werden [22].

Eine weitere Möglichkeit ist die Expression von CD39 und CD73, um Adenosin zu exprimieren, welches die Proliferation von Effektorzellen vermindert, zusätzlich die Produktion von IL-6 reduziert, und die Freisetzung von TGF- β induziert, wodurch es zu einer Induktion von iTregs führen könnte [21]. In Abbildung 4 werden die unterschiedlichen Funktionsweisen der Tregs grafisch dargestellt.

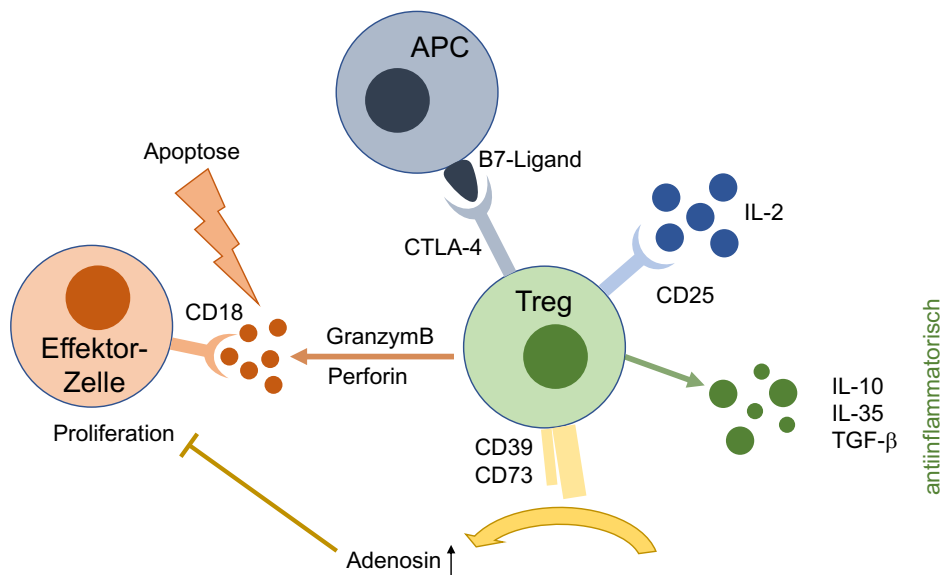


Abbildung 4: Funktionsweise der Tregs.

In der Abbildung werden die unterschiedlichen Funktionsweisen der Tregs dargestellt. Über die Konkurrenz mit dem B7-Liganden kommt es zur Inhibition der Verbindung zwischen APC und Effektorzellen. Die Inhibition von Effektorzellen erfolgt über die Erhöhung von Adenosin, ebenso können Effektorzellen direkt über Perforin und GranzymB zur Apoptose gebracht werden. Der CD25-Rezeptor sorgt für eine Verminderung der Proliferation von Effektorzellen durch IL-2. Zudem produzieren Tregs weitere antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-35 und TGF- β (modifiziert nach [23]).

1.1.3.2 FoxP3-Expression

Wie bereits oben beschrieben ist die Expression von FoxP3, welches auf dem X-Chromosom gelegen ist, entscheidend für die Funktion der Tregs. Die Bedeutung von FoxP3 zeigt sich bei nur geringer Produktion oder vollständigem Fehlen. Dies ist bei dem seltenen angeborenen IPEX-Syndrom (X-chromosomal vererbte Immundysregulation) aufgrund einer Mutation im FOXP3-Gen auf dem

X-Chromosom der Fall. Klinisch imponieren Durchfälle, Dermatitis und Diabetes mellitus sowie autoimmune Polyendokrinopathie als frühe Symptome. Die meisten Patienten versterben innerhalb von drei Jahren [24].

Das FOXP3-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und findet sich wesentlich in CD4⁺CD25⁺-Tregs exprimiert. Die Regulierung findet über epigenetische Modifikationen statt. Bei Tregs zeigt sich die Promoter-Region demethyliert. Bei Stimulation des T-Zell-Rezeptors kommt es durch Entfernung von PIAS1 (protein inhibitor of activated STAT1) zur Expression von FoxP3. Ebenfalls spielen CNS eine entscheidende Rolle. Wie bereits oben erwähnt führen diese zu einer Stabilisierung von nTregs über CNS-2, auch Treg-specific de-methylated region (TSDR) genannt, oder Induktion von iTregs über CNS-1 [24, 25].

CNS-0 ist entscheidend für die FoxP3-Expression in Reaktion auf eine Stimulation mit IL-2. Durch die epigenetische Modifikation der CNS-Regionen und des Promoters kann die Methylierung der Regionen zu einem Verlust der suppressiven Funktion durch Herunterregulation von FoxP3 und einer Expression proinflammatorischer Zytokine führen [26]. Dies wird in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

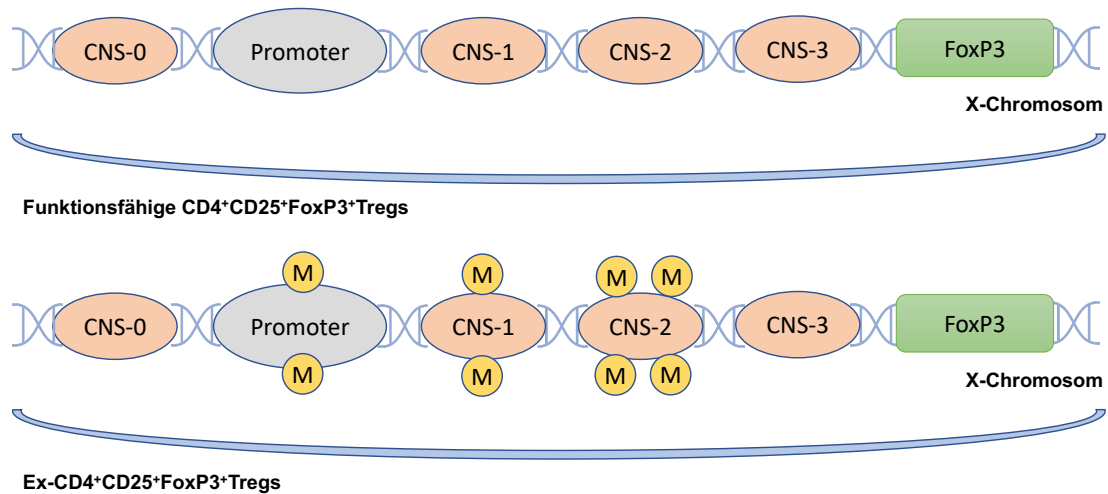


Abbildung 5: Darstellung des FOXP3-Gens auf dem X-Chromosom.

Das FOXP3-Gen besteht aus 4 CNS-Regionen, welche gemeinsam mit der Promoterregion für die Regulation von FoxP3 verantwortlich sind. Durch Methylierung dieser Regionen kommt es zu einer reduzierten FoxP3 Expression und hierdurch geminderten Funktion der Tregs. CNS-2 wird hierbei häufig auch TSDR genannt (modifiziert nach [27]).

Die regulatorische Aktivität durch FOXP3 erfolgt durch verschiedene Mechanismen. Über Runx-related transcription factor 1 (RUNX1) können die Expression von Effektorzytokinen (IL-2, IL-7, IFN γ) reduziert sowie Moleküle wie CD25 und CTLA-4 hochreguliert werden [28]. Ebenso kann das FOXP3-Gen über direkte Interaktion mit ROR γ und ROR α Transkriptionsfaktoren antagonisieren und dadurch zu einer Inhibition von Th17-Zellen führen [29].

1.1.4 Th17 Zellen

Eine Subpopulation der CD4-T-Effektorzellen bilden die Th17-Zellen. Diese entstehen durch Anwesenheit von IL-6 und TGF- β nach Aktivierung einer naiven T-Zelle über den T-Zell-Rezeptor. IL-6 und TGF- β entstehen durch angeborene Immunzellen in der Reaktion auf eine Infektion durch ein Pathogen [30].

Zur weiteren Reifung und Funktion ist die Anwesenheit von IL-23 notwendig. Über die Aktivierung von signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) durch IL-6 und IL-21 sowie IL1 β erfolgt die Transkription von

IL-23-Rezeptor (IL-23R), IL-17 und RAR-related orphan receptor γ t (ROR γ t) [31, 32]. TGF- β sorgt indirekt durch eine Inhibierung von T-box transcription factor (T-bet) und GATA-3 zu einer verminderten Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen. Jedoch zeigt sich bei hohen Konzentrationen von TGF- β 1 auch ein negativer Effekt auf Th17-Zellen durch Inhibierung von IL-23R und einer Produktion von IL-10 sowie dem im Kapitel oben beschrieben Einfluss auf die Induktion von Tregs [33].

Th1- und Th2-Zellen und Tregs konkurrieren mit Th17-Zellen, sodass diese über die Zytokine IL-2, IL-27, IL-12 und IL-4 die Entwicklung von potenten Th17-Zellen unterdrücken.

Auf der Oberfläche der Th17-Zellen findet sich CCR6 als Rezeptor für CCL-20, der durch TGF- β induziert wird und als Chemoattraktor für weitere Th17-Zellen dient [34].

Wie alle CD4-T-Effektorzellen nutzen auch Th17-Zellen für die Umsetzung ihrer Funktion die Produktion von membranständigen Proteinen und Zytokinen, welche sowohl lokal als auch auf entfernte Ziele wirken. Dies geschieht durch die Freisetzung von IL-17, IL-21, IL-22 und GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulation factor). Hierüber entsteht durch die Stimulation von neutrophilen Granulozyten und lokalen Zellen zur Freisetzung weiterer Zytokine und Chemokine eine Abwehr insbesondere gegen Bakterien und Pilze. Bei Patienten mit chronischen Pilzinfektionen konnte beispielsweise ein Mangel an IL-22 und IL-17 nachgewiesen werden [35].

Auf der anderen Seite scheinen Th17-Zellen eine kritische Rolle in Autoimmunkrankheiten wie Multipler Sklerose, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, rheumatoider Arthritis und Psoriasis zu haben, worauf im späteren noch weiter eingegangen wird [1, 36, 37].

1.1.5 IL-17

IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin bestehend aus einer Zytokinfamilie aus 6 Mitgliedern (IL17A-F), welches über die Rezeptoren für IL17A und IL17F Zellen wie beispielsweise Fibroblasten, Epithelzellen oder Keratinozyten zur

Produktion von IL-6 und granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) anregt und damit Neutrophile anlockt [1].

Die Produktion von IL-17 erfolgt hauptsächlich durch Th17-Zellen, wobei auch Zellen wie beispielsweise CD8⁺-T-Zellen und Natürliche Killerzellen IL-17 produzieren können [38].

IL-17 ist wichtig für den Körper, kann aber auch bei einigen Krankheiten in erhöhter Konzentration wieder. Über IL-17 erfolgt eine Immunantwort insbesondere gegen Bakterien und Pilze als Abwehrmechanismus des Körpers. Jedoch spielt IL-17 auch bei Autoimmunerkrankheiten wie bspw. Asthma bronchiale, Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis oder Systemischen Lupus Erythematoses proinflammatorisches Zytokin eine zentrale Rolle [39].

1.1.6 T-Zell Plastizität

Die Vorstellung, CD4⁺-T-Effektorzellen würden sich aus naiven CD4⁺-T-Zellen differenzieren und ihren Phänotyp für immer beibehalten, ist nicht korrekt. Nach Differenzierung und Ausbildung eines spezifischen Phänotyps können sich die Zellen durchaus wieder in andere CD4⁺-T-Effektorzellen in Abhängigkeit des Milieus umwandeln. Man spricht hierbei von T-Zell-Plastizität und gewährt eine angepasste Immunreaktion des Körpers auf verschiedene Krankheitserreger [1]. Ebenso scheint dies eine maßgebliche Rolle in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu haben [40].

1.1.6.1 Th17 Plastizität

Insbesondere eine Plastizität bei Th17-Zellen konnte hierbei gezeigt werden. Durch die Stimulation von Th17-Zellen mit IFN γ und IL-12 konnte eine Polarisation zu Th1/Th17-Zellen, welche eine Expression von ROR γ t, T-bet und CD161 zeigten, erreicht werden [41]. Sie scheinen eine entscheidende Rolle in Autoimmunerkrankungen zu spielen [42].

Eine Konversion von Th17-Zellen zu Th2-Zellen konnte im Mausmodell in vivo nach Infektion mit gastrointestinalen Helminthen festgestellt werden. Hierbei

zeigte sich eine Reduktion von IL-17-spezifischen Zytokinen hin zu Sezernierung von IL-4 [43].

1.1.6.2 Treg-Plastizität

Auch bei Tregs konnte im Laufe der Zeit eine Plastizität nachgewiesen werden. Ein Th1-ähnlicher-Phänotyp mit Koexpression von T-bet und FoxP3 zeigte sich zunächst im Mausmodell [44]. Unter Stimulation mit IL-12 und IL-2 konnte in vitro eine Hochregulation von Th1-Zell-typischen Markern wie T-bet, CXCR3 und IFN γ nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich der Verlust der suppressiven Funktion. Dennoch konnte epigenetisch weiterhin eine Demethylierung der TSDR-Region, ähnlich zu funktionsfähigen Tregs, gezeigt werden [45]. Th1-ähnliche-Tregs konnten insbesondere bei unbehandelten Patienten mit Multipler Sklerose im peripheren Blut gefunden werden und werden als möglicher Pathomechanismus diskutiert [46].

Eine Plastizität von Tregs zu Th-17-Zellen konnte erstmalig bei Mäusen durch Stimulation mit IL-6 in Anwesenheit von TGF- β nachgewiesen werden [47]. TGF- β wird demnach sowohl bei der Induktion von Th-17 Zellen als auch bei der Induktion von iTregs benötigt (vgl. Kapitel 1.1.2). Weitere Studien zeigten die Produktion von IL-17 durch FoxP3⁺ Tregs bei Vorhandensein von IL-6 und IL-1 β durch die Modulation von STAT3, ROR γ t und ROR α [48, 49]. Interessanterweise konnte in Studien ein Erhalt der suppressiven Funktion von FoxP3⁺, IL-17-produzierenden Tregs in Abwesenheit von IL-1 β und IL-6 gezeigt werden [50]. Längere Stimulation führte jedoch zu einem zunehmenden Verlust von FoxP3 und damit zur Reduktion der suppressiven Funktion [51]. Insbesondere bei Patienten mit Psoriasis spielt das Ungleichgewicht der Tregs und IL-17-produzierenden Th-17 Zellen eine maßgebliche Rolle. Durch Induktion von Tregs mit IL-23 konnte in peripheren Hautläsionen eine starke Verschiebung von Tregs zu Th17-Zellen nachgewiesen werden [51]. Ebenfalls wird auf epigenetischer Ebene eine Differenzierung durch Deacetylierung von Histonen durch die Histon-Deacetylase 1 (HDAC-1), welche in der Haut von Patienten mit

Psoriasis erhöht ist, diskutiert [51, 52]. Eine Zusammenfassung der Plastizität von Tregs wird in Abbildung 6 dargestellt.

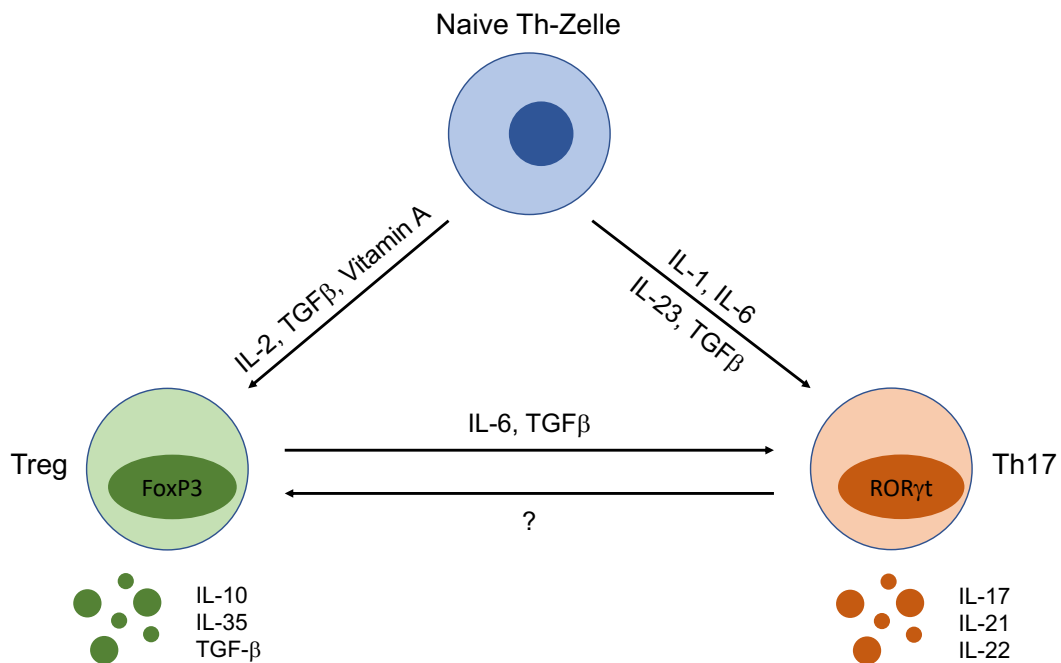


Abbildung 6: Treg/Th17-Plastizität.

In der Abbildung wird die Differenzierung von naiven Th-Zellen zu Th17-Zellen und Tregs dargestellt. Zudem zeigt sich nach der Differenzierung unter Stimulation mit IL-6 und TGF- β eine Plastizität von Tregs zu Th17-Zellen unter Verlust von FoxP3 und Expression von ROR γ t. Die Möglichkeit der Verschiebung von Th17-Zellen zu Tregs ist Teil der aktuellen Forschung (modifiziert nach [53]).

1.2 Psoriasis

Psoriasis vulgaris ist eine häufige chronisch entzündliche Erkrankung der Haut. Sie tritt vor allem an den Streckseiten der Extremitäten in Form von scharf begrenzten schuppenden Plaques auf. Häufig finden sich ein ausgeprägter Juckreiz und Nagelveränderungen. Neben den Veränderungen der Haut existieren weitere psoriatische Erkrankungen wie beispielsweise die Psoriasisarthritis, die mit Gelenksbeschwerden einhergeht, oder die Psoriasis pustulosa, einer generalisiert auftretenden Form mit schweren Krankheitsverläufen.

1.2.1 Epidemiologie

Psoriasis tritt auf der ganzen Welt mit einer Prävalenz zwischen 0,09% und 11,4% in Erscheinung [54, 55]. In Deutschland wird nach aktuellen Studien die Prävalenz zwischen 2% und 3% angegeben [56, 57]. Die Erkrankung kann in jedem Alter auftreten. Es existieren hierzu unterschiedliche Studien, welche ein Erkrankungsalter ab dem 3. Lebensjahrzehnt und einem Höhepunkt um das 46. Lebensjahr beschrieben oder zwei Erkrankungsgipfel zwischen dem 2. Lebensjahrzehnt und dem 6. Lebensjahrzent [58, 59]. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern konnte nicht festgestellt werden [60].

1.2.2 Ätiopathogenese

Die Ursache der Psoriasis ist bis heute nicht vollständig verstanden. Es wurden einige Gene als Risikofaktoren für die Entstehung der Erkrankung diskutiert, welche das Immunsystem betreffen und hierbei insbesondere die Th17/IL-23 Achse [61]. Im Jahr 2014 konnten erstmals das Autoantigen LL37, welches ein antimikrobielles Peptid ist und T-Zellen bei Patienten mit Psoriasis aktivieren kann, als Unterstützung der These einer T-Zell vermittelten Autoimmunkrankheit gefunden werden [62]. Es wurden zudem endogene und exogene Auslösefaktoren identifiziert, beispielsweise Arzneimittel, leichte Traumata,

psychische Belastung und Stress [63]. Hauptgegenstand der aktuellen Forschung ist die Rolle des Immunsystems.

In der Entstehung der Erkrankung sind zahlreiche verschiedene Zellen wie Keratinozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, T-Zellen, neutrophile Zellen involviert, die miteinander in Verbindung stehen und eine chronische Entzündung auslösen.

Der Haupttreiber für die Entstehung der Erkrankung scheint die IL-23/Th17-Achse zu sein. Hierbei werden an erster Stelle plasmazytoide dendritische Zellen über verschiedene Toll-Like-Rezeptoren durch eigene RNA-Fragmente oder DNA von Bakterien oder Viren aktiviert, welche anschließend $IFN\alpha$ sekretieren. Hierüber erfolgt die Aktivierung von T-Zellen und myeloiden dendritischen Zellen, die über Chemokine in die Haut rekrutiert werden und dort proinflammatorische Zytokine wie $IFN\gamma$, IL-6, IL-20 und IL-23 produzieren. Dort kommt es insbesondere durch IL-23 zur Differenzierung von T-Zellen zu Th-17 Zellen, welche neben neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und innatem lymphoiden Zellen den Hauptanteil an der Produktion von IL-17 ausmachen. Durch die Produktion von CCL20 werden weiterhin $CCR6^+$, IL-17-produzierende Zellen angezogen. IL-17 stimuliert Keratinozyten und führt zur weiteren Produktion und Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses in der Haut. Des Weiteren erfolgt durch IL-22 und IL-20 das Signal zur Hyperproliferation der Keratinozyten und damit typischen klinischen Erscheinung der schuppigen Haut [64, 65].

1.2.3 Klinik

Verschiedene Verlaufsformen werden abhängig von der Lokalisation der typischen Effloreszenzen und des Schweregrades bei der Psoriasis unterschieden. Diese sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Verlaufsformen der Psoriasis [66].

Verlaufsform	Erscheinungsbild
Psoriasis guttata	Tropfenförmige Effloreszenzen, häufig aufgrund Auslösefaktoren (Medikamente)
Psoriasis inversa	Beugeseitig oder intertriginöse ohne typische Schuppung
Psoriasis pustulosa	Sterile Pusteln als Ausdruck der Ansammlung von Neutrophilen
Psoriasis palmaris et plantaris	Befall der Handflächen und Fußflächen, häufig aufgrund von mechanischen Reizen
Erythrodermische Psoriasis	Maximalvariante mit Befall von über 95% der Körperoberfläche

Die Diagnosestellung folgt in der Regel durch die typische Klinik und klinischen Zeichen. Hierbei findet sich insbesondere das Kerzenfleckphänomen, bei welchem sich durch Kratzen die typische Schuppung lösen lässt. Nach Entfernung der Schuppe zeigt sich ein blattartiges, feucht wirkendes Häutchen als Phänomen des letzten Häutchens. Anschließend kommt es häufig zu punktförmigen Blutungen, dem Auspitz-Phänomen. Eine Biopsie zur Diagnosesicherung ist nur selten nötig. Eine Einschätzung des Schweregrades kann über den PASI („Psoriasis Area and Severity Index“) oder die BSA („Body Surface Area“) erfolgen [67]. Daneben wird der DLQI („Dermatology Life Quality Index“) zur Einschätzung der aktuellen Lebensqualität verwendet. Hieraus ergibt sich die unterschiedliche Einteilung der Schwere der Erkrankung. Die leichte Psoriasis ist definiert über den PASI ≤ 10 oder BSA ≤ 10 und DLQI ≤ 10 . Eine mittelschwere bis schwere Psoriasis als PASI >10 oder BSA >10 und DLQI >10 [68]. Zudem wird von einer mittelschweren bis schweren Psoriasis gesprochen, wenn die Erkrankung in sichtbaren Arealen vorkommt, ausprägt die Kopfhaut betrifft, eine Erkrankung des Genitalbereichs oder der Hände und Füße auftritt, mindestens zwei Fingernägel betroffen sind und ein ausgeprägter Juckreiz, sowie therapieresistente Plaques vorliegen [69].

1.2.4 Therapieregime

Die Therapie der Psoriasis soll zu einer Verbesserung der Symptomatik und damit einhergehend Verbesserung der Lebensqualität führen. Hierfür dient zur Therapieentscheidung die Einschätzung des Schweregrades der Erkrankung nach oben genannten Kriterien. Zunächst ist es wichtig, Auslösefaktoren möglichst zu meiden. Hierzu zählen beispielsweise mechanische Reize, Noxen (bspw. Nikotin), sowie bestimmte Medikamente oder Stress. Des Weiteren sollte auf eine Gewichtsnormalisierung und körperliche Aktivität geachtet werden. Bei leichtem Verlauf der Psoriasis werden zunächst topische Medikamente zur Behandlung empfohlen. Als Basistherapie dienen Harnstoff und Salizylsäure, sowie rückfettende Cremes zur Keratolyse. Die weiteren in Abbildung 7 dargestellten topischen Medikamente dienen der Reduktion der Inflammation und Proliferation von Keratinozyten.

Bei unzureichendem Ansprechen der Lokalthherapie oder mittelschwerer bis schwerer Psoriasis kann eine systemische Therapie der Psoriasis erwogen werden. Hierzu zählt zum Beispiel die Phototherapie, bei der die Haut mit UV-Licht bestrahlt wird.

Zur systemischen Therapie kommen verschiedene Klassen an Wirkstoffen in Frage. Retinoide wie Acitretin wirken antiproliferativ auf Keratinozyten, sowie antiinflammatorisch. Ciclosporin als Calcineurin-Inhibitor hemmt die IL-2 Produktion, wodurch T-Lymphozyten weniger stark aktiviert werden. Fumarsäureester wirken immunmodulatorisch durch Induktion des HO-1 Proteins mit Einfluss auf IL-8 und Tumornekrosefaktoren. Methotrexat führt als Folsäureantagonist zu einer Reduktion der DNA-Synthese und damit zur Immunsuppression.

Neuere medikamentöse Ansätze aus der Gruppe der Biologika sollen spezifischer an der Ursache der Entstehung der Erkrankung wirken. Eingesetzt werden sie, wenn kein ausreichender Therapieerfolg durch oben genannte Medikamente eintritt oder Unverträglichkeiten aufgetreten sind (s. Abbildung 7), können jedoch auch in der ersten Therapielinie eingesetzt werden.

Hierzu zählen insbesondere Antikörper gegen $TNF\alpha$, IL-23 und IL-17, welche die chronische Entzündung der Erkrankung hemmen. Studien konnten hierbei für alle Biologika eine positive Auswirkung auf den PASI zeigen. Für Secukinumab konnten Studien eine Verbesserung des PASI mit einer Reduktion um 75% des Ausgangswertes bei über 80% der Patienten nach Therapie über 12 Wochen nachweisen [70].

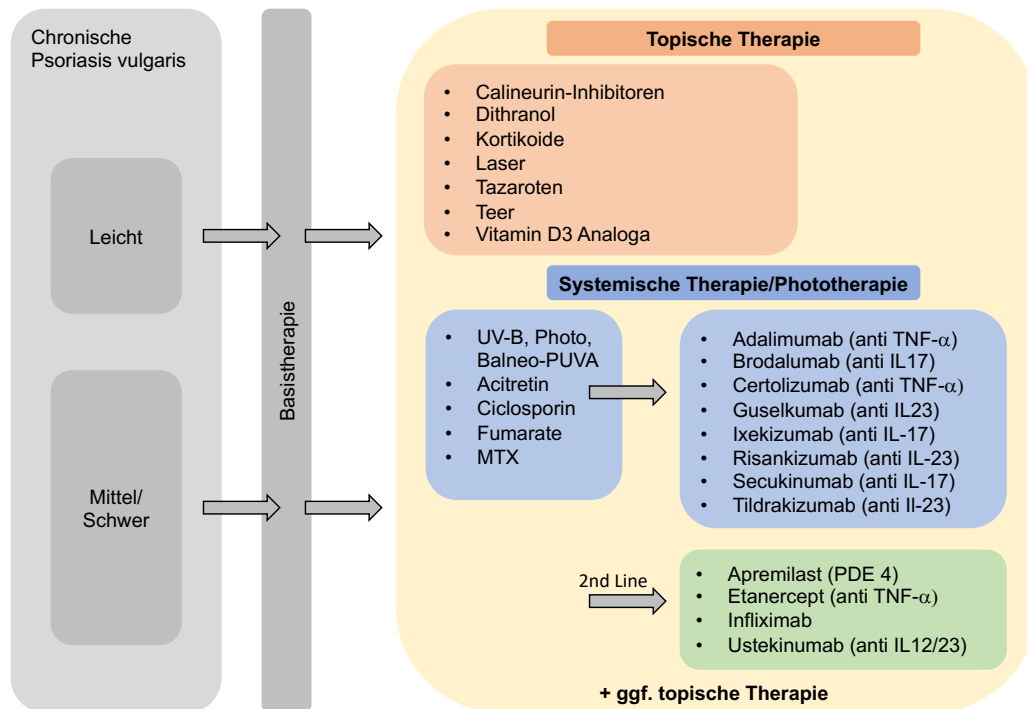


Abbildung 7: Therapieoptionen bei Patienten mit Psoriasis.

In der Abbildung werden die verschiedenen Therapieoptionen dargestellt. Zunächst erfolgt die Einteilung des Schweregrades. Bei leichter Psoriasis kommen zunächst topische Therapien zur Anwendung. Bei mittlerer bis schwerer Psoriasis erfolgt eine Therapieeskalation mittels Phototherapie bzw. Systemtherapie, ggf. auch kombiniert mit topischer Therapie.

Neben der Therapie der Psoriasis ist es außerdem wichtig, Begleiterkrankungen, die häufig auftreten, frühzeitig zu erkennen und zu therapieren. Hierzu zählen beispielsweise die Psoriasisarthritis, Insulinresistenz, Adipositas, Arteriosklerose, Depressionen und das metabolische Syndrom [60].

Zielsetzung und Rationale

Interleukin-17 wurde als ein entscheidendes Zytokin in der Pathogenese des Entzündungsgeschehens bei Patienten mit Psoriasis und Psoriasisarthritis identifiziert [65, 71, 72]. Produziert wird IL-17 hauptsächlich durch Th17-Zellen, welche durch proinflammatorische Zytokine induziert werden. IL-17 führt anschließend zu einer Stimulation von Keratinozyten, sowie weiterer Induktion einer Inflammation.

In den letzten Jahren konnte eine starke Verbindung zwischen Th17-Zellen und Tregs gezeigt werden. Unter unterschiedlichen Stimulationen konnte eine Plastizität nachgewiesen werden, wodurch Tregs ihre suppressive Funktion verloren und sogar selbst IL-17 produzierten [51, 73, 74]. Dies wird maßgeblich als Pathomechanismus für die Erkrankung verantwortlich gemacht. Daher wurden therapeutische Antikörper entwickelt, welche bereits in klinischem Einsatz gute Wirkung zeigen.

Unter anderem konnte Secukinumab als monoklonaler Antikörper gegen IL-17A bereits erfolgreich in der Klinik bei Psoriasis-Patienten eingesetzt werden [75].

Der Einfluss von IL-17 auf Tregs und die Wirkung der Hemmung von IL-17 auf Tregs wurde bisher wenig untersucht. Ob IL-17 zum Verlust der Suppressionsfähigkeit von Tregs führt und die Blockade von IL-17 die suppressive Funktion der Tregs verbessert, bleibt aktuell unbeantwortet.

Gleichfalls besteht die Frage nach Veränderung des Phänotyps von Tregs unter einem Th17-stimulierenden, proinflammatorischen Milieu im Vergleich zur Stimulation mit IL-17 oder unter IL-17-Blockade.

Um die Polarisierbarkeit der naiven T-Zellen und Tregs unter verschiedenen Stimulationen und Inhibitionen des IL-17 Signalwegs zu untersuchen, wurden in der Arbeit folgende Ziele formuliert:

- Qualitative und quantitative in vitro Charakterisierung der T-Zell Subpopulationen bei Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Probanden (HC)

- Einfluss von IL-17, anti-IL17 und Th17-stimulierenden Zytokinen auf den Phänotyp und die Funktionalität von Tregs von PSO und HC.

2 Material und Methoden

Im Folgenden findet sich eine Auflistung der verwendeten Materialien mit Herstellerangaben sowie eine ausführliche Beschreibung der angewandten experimentellen Methoden.

1.1 Material

2.1.1 Geräte

Die Geräte und Instrumente für die experimentelle Arbeit sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Geräte

	Handelsname	Hersteller	S.-Nr.
Mikroskop	Wilovert S 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland	1010335
Inkubator	B 5060 EK-CO2	Heraeus Hanau, Deutschland	50001834
Sterilbank	Gelaire BSBS 6A - Laminar Flow Hood	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Deutschland	11031
Laborpumpe	Laborport Mini-Laborpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland	N86KN.18
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland	504-10000-001
pH-Meter	pH523	WTW, Weilheim i. OB, Deutschland	09070190
Zentrifuge	Universal 32R Rotanda/K	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D	0000645 2260

Waage	TP3002	Denver Instrument, Bohemia, USA	09070190
	Sartorius CP124S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	16208517
Wasserbad	GFL Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland	10549879
Kühlschrank	Liebherr Kühl- Gefrierkombination, CN 3866, 4 °C	Liebherr- International AG, Bulle, Schweiz	3866-20B- 001
	Liebherr Comfort G3013/20, -20 °C		1013508
	Hera Freeze -80°C	Thermo Fisher, Langenseibold, D	51019576
Gefrierbehälter	Nalgene Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Langenseibold, Deutschland	51000001
Eisbereiter	AF 103	Scotsman Ice, Mailand, Italien	474-0110
Inkubator	B 5060 EK-CO2	Heraeus Hanau, Deutschland	50001834
Kohlenstoffdioxid- tank	CO2, 10 l Tank, 100 bar	Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels, Deutschland	
Stickstofftank	Arpege 55- Lagerungssystem	Air Liquide, Paris, Frankreich	941744
	Vakuum- superisolierter Flüssig- Stickstofftank 200- VL/R	Cryoson GmbH, Schöllkrippen, Deutschland	
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	338962
Pipetten	Research 0,1-2,5µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	326522
	Research plus 10µl		492499Z
	Research plus 100µl		493057Z

	Research plus 200µl Research plus 1000µl Easypet		379067Z 494528Z 3033181
	PipetBoy PipetBoy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland	101713 200464
Vortexmischer	Retsch Mixer	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland	
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	A.Hartenstein, Würzburg, Deutschland	ZK06
MACS	VarioMACS™	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach Deutschland	130-090- 282

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien, welche für die Experimente verwendet wurden, werden in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

	Handelsname	Hersteller	S.-Nr.
Falcon Röhrchen	Cellstar, 15ml Cellstar, 50ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	188271 227261
Eppendorf Röhrchen	Safe Seal 0,5ml Safe Seal 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	72.704 72.706
Einmalpipette	Cellstar, 5ml Cellstar, 10ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	606 180 607 180
Zentrifugen- röhrchen	Cellstar® Tube 15 ml Cellstar® Tube 50 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland	188271 227261

Glaspipette	Fortuna Messpipette 5ml Fortuna Messpipette 10ml Fortuna Messpipette 20ml	Poulten & Graf GmbH, Wertheim am Main, Deutschland	1 10032404 1 10037404 1 10041402
Pipettenspitzen	Biosphere Filter tips 10µl Biosphere Filter tips 200µl Biosphere Filter tips 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	70.1130.210 70.760.211 70.762.211
Falcon Röhren Filter	EASYstrainer: 70µm - sterile	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland	542 070
Sterilfilter	Nalgene Rapid Flow	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	291-4520
Zellkulturplatten	96 Well Cell Culture Plate U-Bottom	VWR, Radnor, USA	10062-902
Einfrierröhrchen	CyroTubes™	VWR, Radnor, USA	10018-734
MACS-Columns	MACS Separation Columns LD MACS Separation Columns MS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach Deutschland	130-042-901 130-042-201
FACS-Tube	FACS Round Bottom Tubes 5ml, Polystyrol	Corning Science México, Reynosa, Mexiko	352008
Blutentnahmeutensilien	EDTA-Monovette NH4-Heparin-Monovette Z-Gel-Monovette Safety-Multifly 21G	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	05.1167 02.1064 03.1524 85.1638.235
Serumröhrchen	Mikro-Schraubröhre 1,5ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland	72.692.005
Handschuhe	Dermagrip® Vinyl Examination Gloves	WRP, Sepang, Malaysia	D1501-11

2.1.3 Puffer und Medien

Die Puffer und Medien, die in den Experimenten verwendet wurden, werden in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Puffer und Medien

	Handelsname	Hersteller	S.-Nr.
Phosphate buffered saline	PBS	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA	18912-014
Bovines Serum Albumin	BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A9647-100G
DMSO	Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	337260930
Penicillin-Streptomycin	Pen/Strep-PreMix, Cellpure® HP10.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	197258696
RPMI	RPMI-1640 Medium with L-glutamine and sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	R8758-500ML
Ficoll	FicoLite-H	Linaris blue GmbH, Wertheim, Deutschland	Cat: GTF1511KYA Lot: 151132P
Fixations-puffer	Diluent Buffer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	Cat: 51-9008101 Lot: 7146724
	Fix/Perm™ Buffer (4x)		Cat: 51-9008100 Lot: 7146723
Permeabilisierungspuffer	BD Perm/Wash™ Buffer (10x)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	Cat: 51-9008102 Lot: 7251647

2.1.4 Gebrauchsfertige Lösungen

Gebrauchsfertige Lösungen und deren Zusammensetzung werden in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Gebrauchsfertige Lösungen

	Bestandteile
Nährmedium (NM)	RPMI + 1% PenStrep + 10% FBS (Fetal Bovine Serum)
Erythrozyten-Lysis-Puffer	8,02 g NH ₄ Cl + 0,84 g NaHCO ₃ + 0,37 g EDTA in 1 l destilliertes Aqua, pH-Adjustierung auf 7,3
Einfriermedium	RPMI + 20% FBS + 10% DMSO + 1% Pen/Strep
PBS	1 PBS-Tablette für 500ml Volumen (aufgelöst in Aqua dest.)
FACS-Puffer	0,5% BSA + 0,01% NaN ₃ + 2 PBS Tabletten in 1000 ml destilliertes Aqua
MACS-Puffer	0,5% BSA + 584,8 mg EDTA + 2 PBS Tabletten in 1000 ml destilliertes Aqua, pH-Adjustierung auf 7,2

2.1.5 Gebrauchsfertige Kits

Gebrauchsfertige Kits, welche für unsere Experimente verwendet wurden, zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Gebrauchsfertige Kits

	Handelsname	Hersteller	Lot. Nr.
MACS-Kit II Treg Cell Isolation	CD4+CD25+CD127dim/- T Cell Isolation Kit (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-094-775

2.1.6 Stimulationen und Hemmstoffe

Verschiedene Stimulationen und Hemmstoffe werden in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Stimulationen und Hemmstoffe

	Beschreibung	Hersteller	Produkt- Nr.	
Anti-CD3-Antikörper	LEAF™ Purified anti-human CD3 Antibody, Klon: OKT3	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 317315 Lot: B225107	
Anti-CD28-Antikörper	LEAF™ Purified anti-human CD28 Antibody Klon: CD28.2		Cat: 302923 Lot: B247405	
Secukinumab	Cosentyx® 150 mg Injektionslösung	Novartis	SF996 S0014A	
Anti-IL-17A	Anti-Interleukin-17A, Klon eBio64CAP17	Invitrogen Thermo Fisher	REF: 16717885 Lot: 4344992	
IL-17A	Recombinant Human Interleukin-17A	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 570504 Lot: B205785	
IL-1β	Recombinant Human Interleukin-1β		Cat: 579404 Lot: B213360	
TGF-β1	Recombinant Human Transforming Growth Factor-β1		Cat: 580704 Lot: B225284	
IL-6	Recombinant Human Interleukin-6		Cat: 570804 Lot: B226168	
IL-23	Recombinant Human Interleukin-23		Cat: 574102 Lot: B215828	
Ionomycin			Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I0634-1MG
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate			P1858-1MG
Brefeldin A		B6542-5MG		
CFSE	Carboxyfluoreszeindiacetat-Succinimidylester	BioLegend, San Diego, USA	Cat: 422701 Lot: B181903	

2.1.7 Antikörper

Antikörper, die zur Zellfärbung in den Experimenten verwendet wurden, werden in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Antikörper zur Zellfärbung

Antikörper gegen	Fluorochrom, Farbstoff	Hersteller	Lot. Nr.	Cat.	Klon
CD4	BV421	BioLegend, San Diego, USA	B187127	317434	OKT4
CD4	Alexa Fluor (APCFire)	BioLegend, San Diego, USA	B229075	344638	SK3
CD4	FITC	BioLegend, San Diego, USA	B176551	317408	OKT4
CD4	APC	BioLegend, San Diego, USA	B217365	317416	OKT4
CD8	Alexa Fluor (APC-H7)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	6140812	560179	SK1
CD8	PE Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B216883	344712	SK1
CD8	PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego, USA	B216883	344712	SK1
CD25	PE Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B231345	302612	BC96
CD127	BV421	BioLegend, San Diego, USA	B226832	351310	A019D5
CD127	APC Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B224095	351348	A019D5
CD27	PE Cy7	BioLegend, San Diego, USA	B218389	123216	LG.3A10

CD45RA	FITC	BioLegend, San Diego, USA	B202186	304106	HI100
CD161	APC	BioLegend, San Diego, USA	B200987	339912	HP- 3G10
CXCR3	PE	BioLegend, San Diego, USA	B197483	353706	G025H7
CCR6	APC	BioLegend, San Diego, USA	B189862	353416	G034E3
CCR6	PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego, USA	B205287	353406	G034E3
CCR7	Alexa Fluor (APC Cy7)	BioLegend, San Diego, USA	B219213	353212	G043H7
FoxP3	PE	BD Biosciences, Franklin	7096848	560046	259DIC7
ROR γ t	Alexa Fluor (APC Cy7)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	E10458- 1631	17- 6988- 82	AFKJS- 9
IL-17A	BV421	BioLegend, San Diego, USA	B231952	512322	BL168
IL-10	APC	BioLegend, San Diego, USA	B193895	506807	JES3- 19F1
IFN γ	PE	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	5150112265	130- 540- 201	
INF γ	FITC	BioLegend, San Diego, USA	B179400	502506	4S.B3
TNF α	FITC	BioLegend, San Diego, USA	B147230	502906	MAB11
Perforin	PE	Miltenyi Biotec, Bergisch	5140521082	130- 096- 578	

		Gladbach, Deutschland			
GranzymB	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	5140521092	130- 101- 346	
Zombie AquaTM Fixable Viability Kit	Aqua Dye	BioLegend, San Diego, USA	B223424	77143	

2.1.8 Chemikalien und Gase

Die Liste der Chemikalien und Gase, welche für unsere Experimente verwendet wurden, zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Chemikalien und Gase.

Name	Hersteller	S.-Nr.
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	152918061
Isotonische Kochsalzlösung, 0,9 NaCl	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland	19KM01GB
Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	6329
Natriumazid NaN ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S-8032
Ethanol 70% vergällt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T913.3
Ammoniumchlorid NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A-4514
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E-5134
2-Propanol	VWR, Radnor, USA	20839.366
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.11732.0025
Kohlenstoffdioxid (4.5, Typ 10, tiefkalt, verflüssigt)	Rießner-Gase GmbH, Lichtenfels Deutschland	
Stickstoff	Cryoson GmbH, Schöllkrippen, Deutschland	

2.2 Methoden

2.2.1 Probanden

Die Genehmigung der Studie erfolgte durch die Ethik Kommission der Universität Würzburg (Ethikvotum Nr. 239/10). Alle Probanden wurden in einem ausführlichen ärztlichen Gespräch und mit Hilfe eines Informationsblattes über den Inhalt der Studie aufgeklärt und unterzeichneten die Einverständniserklärung. Die Studie wurde nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki 2013 [76] durchgeführt und beachtet die Prinzipien der Good Clinical und Good Laboratory Practice.

2.2.1.1 Studienpopulation

Die Rekrutierung der Patienten mit Psoriasis (n=10) erfolgte in der Psoriasisprechstunde der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg. Rekrutiert wurden Patienten nach Definition einer geringen Krankheitsaktivität (PASI \leq 10, CRP $<$ 1 mg/dl, Leukozyten $<$ 12000 Zellen/ μ l). Ausschlusskriterien für beide Studienpopulationen waren Malignome, hämatologische Erkrankungen, monogenetische Syndrome, schwere Infektionen, die eine medizinische Behandlung in den letzten 3 Monaten nötig machten, sowie schwere Allergien oder Patienten nach einer Transplantation. Die Demographie der Studienpopulation ist in Tabelle 14 und klinische Daten in Tabelle 15 dargestellt.

2.2.2 Lymphozytenisolierung mittels Dichtezentrifugation

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus heparinisiertem Blut nach dem Prinzip der Dichtezentrifugation gewonnen.

Dabei nutzten wir das Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymere Ficoll als hydrophiles Kolloid, um die Zellen von den übrigen Bestandteilen des Blutes zu trennen. Die maximale Dichte des Mediums überschreitet die maximale Dichte einiger Zellpopulationen, wie den Erythrozyten und Granulozyten, sodass sich

diese bei Zentrifugation am Boden absetzen. Die PBMCs reichern sich aufgrund ähnlicher Dichte im Vergleich zum Medium in einer milchigen Schicht zwischen dem Medium und dem Plasma an. Die Thrombozyten bleiben aufgrund ihrer geringeren Zellmasse zum großen Teil im Serum. [77]

Unter sterilen Bedingungen wurden 20ml des Probandenblutes vorsichtig aus den Heparinröhrchen entnommen und auf 10ml Ficoll geschichtet, welches zuvor in ein 50ml Röhrchen gefüllt wurde. Es ist darauf zu achten, dass sich der Ficoll und das Blut so wenig wie möglich vermischen. Anschließend wurde das Röhrchen bei 1750 rpm für 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Dabei trennten sich die Zellpopulationen auf und die PBMCs können als Trennschicht zwischen Medium und Serum erkannt werden (Abbildung 8). Diese mussten nun vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgetragen und in ein neues 50ml Tube gegeben werden. Dabei sollte so wenig Ficoll wie möglich mit eingesaugt werden, da dieses zytotoxisch wirkt. Das Röhrchen wurde anschließend zum Waschen mit 0,9% NaCl aufgefüllt und 10 min bei 1700 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet zur Beseitigung von übrig gebliebenen Erythrozyten mit 5 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer resuspendiert. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Zellyse mittels 10ml Nährmedium gestoppt, das Röhrchen erneut bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend für die Zellzählung mit 5 ml resuspendiert.

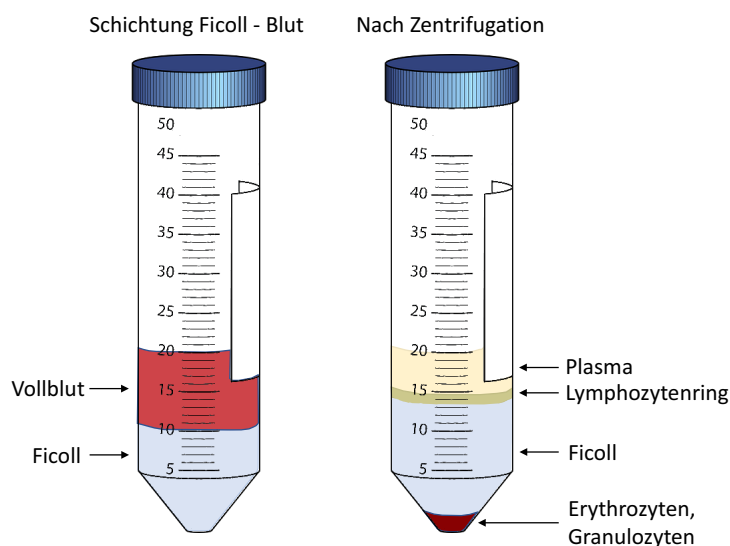


Abbildung 8:
Reaktionsröhrchen vor und nach Dichtezentrifugation.
 Auf der linken Seite ist die Schichtung des Vollblutes auf den Ficoll vor der Zentrifugation gezeigt. Das rechte Reaktionsröhrchen zeigt die Aufteilung des Vollblutes in seine verschiedenen Bestandteile, inklusive des Lymphozytenrings, welcher die PBMC darstellt (modifiziert nach [78])

2.2.3 Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer

Die Zellmenge innerhalb eines Gemisches wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau gemischt. Trypanblau ist eine saure Färbelösung, welche avitale Zellen blau anfärbt. 10 µl des Gemisches wurden nun zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Vitale Zellen wurden in den 4 Großquadranten gezählt und daraus einen Durchschnittswert gebildet. Die Formel zur Errechnung der Zellzahl lautet wie folgt:

Zellzahl (gezählt) x 10^4 x Volumen (des Gemisches) x 10 (Verdünnung) = Zellzahl

2.2.4 Kryokonservierung

Alle PBMC wurden nach der Isolierung eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt mit Ihnen arbeiten zu können. Je 5×10^6 Zellen wurden dafür mit 1 ml Einfriermedium (20%FBS 10%DMSO, 70%RPMI) in Einfrierröhrchen überführt und anschließend für 2 Tage bei -80°C gelagert. Danach wurden sie in Tanks mit flüssigem Stickstoff zur dauerhaften Lagerung gebracht. Da DMSO zytotoxisch wirkt, ist beim Ein- und Auftauen der Zellen darauf zu achten, dass möglichst schnell und auf Eis gearbeitet werden sollte, um die Aktivität der Zellen zu erhalten. Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen in einem Wasserbad erwärmt, bis diese aufgetaut waren. Anschließend wurden sie in 10 ml Nährmedium überführt und bei 1700 rpm zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets mit Nährmedium waren sie für die weiteren Experimente zur Verwendung bereit.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Methodik der Durchflusszytometrie erlaubt es, Zellen anhand ihres Volumens, ihrer Oberflächenbeschaffenheit und ihrer Fluoreszenzmarkierungen zu charakterisieren. Das Prinzip beruht darauf, dass Zellen einzeln durch eine Kapillare gesaugt werden und einen fokussierten Lichtstrahl passieren (s. Abbildung 9). Die Streuung und Fluoreszenz werden anschließend getrennt analysiert.

Detektoren messen die Streuung des Lichtes durch die Zellen. Die Vorwärtsstreuung (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für das Volumen der Zelle, die Seitwärtsstreuung (SSC = Sidewards Scatter) ein Maß für die Granularität der Zelle und die Größe und Struktur des Zellkerns. Mit diesen beiden Größen lassen sich bereits die Zellen des Blutes unterscheiden (s. Abbildung 10). Zusätzlich ist es möglich, Zellen vor der durchflusszytometrischen Messung mittels Fluorochrom markierter Antikörper zu markieren. Die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs werden durch den Laser auf eine höhere Energieebene gebracht und emittieren beim Zurückkehren auf die niedrigere Ebene Photonen, die mit dem Detektor quantifiziert werden können. Es lassen sich dadurch bis zu 1000 Zellen pro Sekunde messen und typisieren. In der anschließenden Analyse lassen sich einzelne Gates festlegen, um Teilpopulationen genauer zu

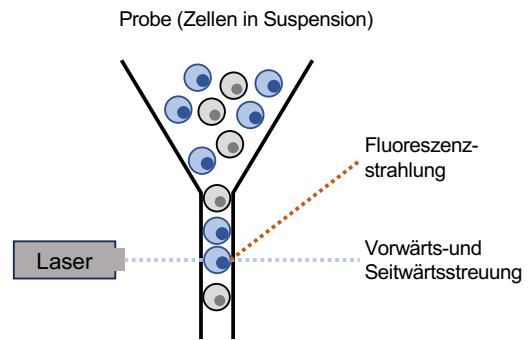


Abbildung 9: Schema der Durchflusszytometrie (modifiziert nach [79]).

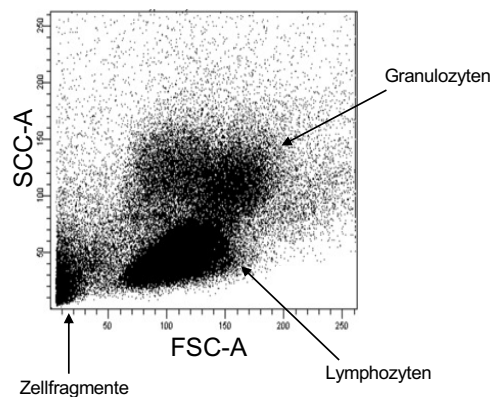


Abbildung 10: Populationen der PBMC in der Durchflusszytometrie.

betrachten. Durch Kombination verschiedener Färbungen und Gates können nun Zellen genau charakterisiert werden.

2.2.6 Extrazelluläre Fluoreszenzfärbung

Mit der extrazellulären Färbung wird die Fluoreszenzfärbung bestimmter Oberflächenmoleküle der Zellen beschrieben. Die im Stickstoff gelagerten Zellen wurden nach Protokoll aufgetaut, gezählt und zunächst für einige Stunden im Kühlschrank belassen, um Ihre Integrität wiederzuerlangen. Für die extrazellulären Färbungen mischte man den jeweiligen Antikörper für jedes Panel zu einem Mastermix zusammen. Dabei gab man zu 50 μ l PBS je 0,3 μ l der Antikörper, die in Tabelle 11 gezeigt sind. Zudem setzte man einen Mastermix mit Zombie für die Färbung der toten Zellen an. Hierfür wurden 1 μ l ZOMBIE auf 500 μ l PBS gegeben.

Zur Vorbereitung der Zellen auf die Färbung wurden sie nach dem Auftauen zunächst durch einen 70 μ m Filter gegeben, um Zellfragmente und andere Konglomerate aus der Suspension zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen auf die benötigte Anzahl an FACS-Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden mit 1 ml unsterilem PBS gewaschen und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen wurde das Zellpellet nach Schema mit 50 μ l des Antikörpergemisches und 50 μ l der ZOMBIE Färbung resuspendiert, die Negativkontrolle lediglich mit 100 μ l PBS. Die Zellen wurden für 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation folgte das Waschen mit 1 ml PBS für 5 min bei 1500 rpm und Resuspension mit 200 μ l FACS-Puffer, bei den Zellen nur extrazellulär gefärbt wurden.

Tabelle 10: Färbepanel für PBMC-Charakterisierung.

Grau hinterlegt sind dabei die intrazellulären, weiß hinterlegt die extrazellulären Färbungen.

Kanal	BD Horizon 500	PE	FITC	Brilliant Violet 412	Alexa Fluor	APC	PeCy7	PerCP/Cy5.5
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-
Färbung 1	Zombie	IFN γ	TNF α	IL-17	CD4 (APCFire)	CD161	CD8	CCR6
Färbung 2	Zombie	CXCR3	CD45RA	CD4	CCR7 (APCcy7)	CCR6	CD27	CD8
Färbung 3	Zombie	FoxP3	CD4	CD127	CD8 (APCH7)	Il-10	CD25	CCR6
Färbung 4	Zombie	Perforin	CD45RA	CD4	CCR7 (APCcy7)	Granzym B	CD27	CD8
Färbung 5	Zombie	FoxP3	CD4	IL-17	CD127 (APCcy7)	ROR γ t	CD25	CCR6

2.2.7 Intrazelluläre Fluoreszenzfärbung

Für die Charakterisierung der PBMCs wurde lediglich Färbung 2 nur mit Antikörpern für Oberflächenmoleküle gefärbt. Die restlichen Zellen wurden außerdem intrazellulär gefärbt, womit die Färbung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren gemeint ist. Damit diese intrazellulär gemessen werden konnten, mussten die Zellen vorher stimuliert werden. Um alle Färbungen miteinander vergleichen zu können, wurden alle Zellen bereits vor der extrazellulären Färbung folgendermaßen stimuliert.

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin dienen als starke unspezifische T-Zell-Stimulatoren, die zu einer Produktion von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren führen. PMA aktiviert dabei direkt die Proteinkinase C, die über weitere Signalwege zu einer Aktivierung der Zelle führt. [80]

Ionomycin gehört zu der Gruppe der Ionophore und fördert die Einfluss von Ca²⁺ Ionen in die Zelle, welches synergistisch zu PMA Signalwege aktiviert.[81]

Brefeldin B sorgt dafür, dass die produzierten Zytokine und Transkriptionsfaktoren nicht aus der Zelle herausgeschleust werden, sondern in ihr verbleiben und anschließend mittels intrazellulärer Antikörper markiert werden können. Dies gelingt edurch die Induktion eines retrograden Transportes vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum [82].

Für die Stimulation gab man die PBMC in Nährmedium für 4 h mit folgenden Konzentrationen der Stimulatoren in den Inkubator:

0,03 µg/ml PMA

1,0 µg/ml Ionomycin

1,0 µg/ml Brefeldin A

Für den Mastermix der intrazellulären Färbung gab man je 0,8 µl der jeweiligen Antikörper zu 50 µl PermWash BD und vermischte diese gründlich.

Für die Zellen, die zudem intrazellulär gefärbt wurden, folgte nach dem Schritt des Waschens die Fixierung der Zellen mit 200 µl Fixationspuffer je FACS-Röhrchen für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl PermWash BD 5 min bei 1500 rpm gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 50 µl des jeweiligen Mastermixes der intrazellulären Färbung, die Negativkontrolle mit 50 µl PermWash BD resuspendiert. Daraufhin inkubierten die Röhrchen für weitere 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zuletzt wurden die Zellen erneut mit 500 µl PermWash BD gewaschen und das Zellpellet mit 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.2.8 Treg-Zellkultur und Stimulationsexperimente

2.2.8.1 Magnetische Zellseparation (MACS)

Zur Durchführung von Zellkulturen mit Tregs wurden diese mittels magnetischer Zellseparation (MACS) aus den PBMCs isoliert. Die Zellen wurden so isoliert, dass die Tregs am Ende die Oberflächenmarker CD4⁺ CD25⁺ und CD127^{dim/-} haben. MACS ist dabei eine für die Zellen schonende Methode mit gleichzeitig hoher Reinheit an Zellen. Dabei werden die Zellen mit Antikörpern, an welchen Eisenpartikel haften, versehen. Anschließend durchlaufen sie ein Magnetfeld und verbleiben, wenn die Antikörper an ihnen gebunden haben, in der Säule. Der Rest der Zellen durchläuft die Säule (s. Abbildung 11).

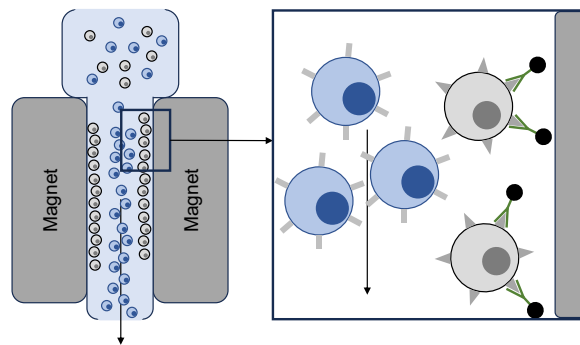


Abbildung 11: Schema der magnetischen Zellseparation.

Im ersten Schritt wurden die Zellen nach CD4-Positivität getrennt. Im zweiten Schritt wurden die CD4⁺-Zellen nach CD25-Positivität aufgeteilt.

Zellen, welche zuvor mittels Eisen-behafteter Antikörper markiert wurden, werden in ein Rührchen zwischen zwei Magneten gegeben. Zellen, welche markiert wurden, wandern nicht der Schwerkraft nach durch das Rührchen, sondern bleiben im Magnetfeld. Zellen ohne Antikörper können das Magnetfeld der Schwerkraft nach passieren (modifiziert nach [83]).

Die PBMCs, die sich in 5ml Nährmedium befinden, wurden für die Isolierung zunächst durch einen Filter gegeben und anschließend mit 10 ml MACS-Puffer bei 1500 rpm für 7 min zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde mit $x \cdot 40 \mu\text{l}$ MACS-Puffer resuspendiert. $x \cdot 10 \mu\text{l}$ der Antikörpermischung (Biotin-Antibody Cocktail II) des Isolierungskits wurden dazugegeben, gemischt und für 5 min im Kühlschrank belassen.

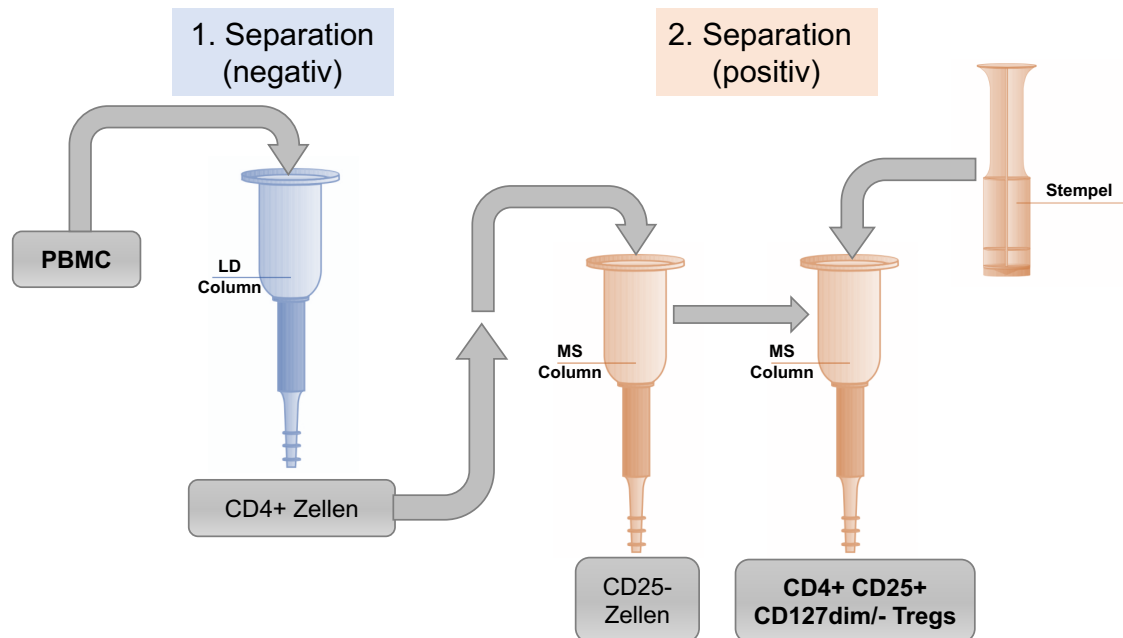


Abbildung 12: Schema der MACS-Isolierung von Tregs.

Die Separation von Tregs erfolgte durch eine zweifache Separation. Durch die erste Separation werden CD4+ Zellen gewonnen. Hierbei durchlaufen CD4 positive Zellen die Säule und werden aufgefangen. Bei der zweiten Separation werden die CD25 positiven Zellen mit Antikörpern markiert, sodass diese nach Durchlaufen der Säule darin verbleiben. Die CD25+ Zellen, welche sich in der Säule befinden werden, anschließend mit Hilfe eines Stempels und Puffer aus der Säule gelöst. (Grafik Säule und Stempel modifiziert nach [84])

Anschließend wurden $x \cdot 30 \mu\text{l}$ MACS-Puffer und $x \cdot 20 \mu\text{l}$ Anti-Biotin MicroBeads hinzugefügt, gemischt und für weitere 10 min im Kühlschrank gelagert. Danach wurden $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer hinzugegeben und die Zelllösung in die vorbereiteten LD-Säulen pipettiert. Für die Vorbereitung des Sorters wurde eine sterile Säule unter dem Abzug in das Gerät eingespannt und zweimal mit 1 ml MACS-Puffer gespült. Nachdem die Zelllösung die Säule passiert hat, wurde nacheinander zweimal mit 1 ml MACS-Puffer gespült. Die sich nun im Falcon Tube befindlichen PBMCs waren nun nach der ersten negativen Selektion CD4⁺-Zellen. Für die zweite positive Selektion wurde zunächst die Säule mit einer MS-Säule ebenfalls unter sterilen Bedingungen ausgetauscht und dreimal mit $0,5 \text{ ml}$ MACS-Puffer gespült.

Die CD4⁺-Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend mit x * 90 µl MACS-Puffer resuspendiert. x * 10 µl CD25 MicroBeads II wurden hinzugefügt, gut gemischt und für 15min im Kühlschrank gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen (1200rpm, 5min) und nach Resuspension mit 0,5 ml MACS-Puffer auf die vorbereitete MS-Säule gegeben. Sobald die Zellsuspension vollständig durchgelaufen war, wurde die Säule dreimal mit je 0,5 ml MACS-Puffer gespült. Danach wurde sie vorsichtig aus dem Gerät entnommen, und auf ein Falcon Röhrchen gesetzt. Es wurden 1 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und mit einem Stempel durchgepresst, sodass die Zellen, die nach der Isolierung in der Säule verblieben waren, im Falcon Röhrchen aufgefangen wurden. Diese Zellen stellten die fertig isolierten CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} Tregs dar.

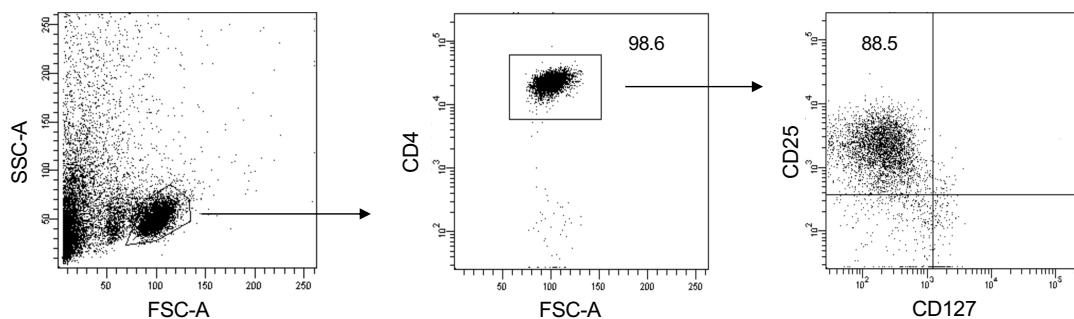


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Messung der Reinheit nach Zellseparation.

Dargestellt wird der Reinheitsgrad an CD4-Positivität und an Tregs nach MACS-Isolierung in Prozent.

2.2.8.2 Proliferationsmessung mittels CFSE

Um in Zellkulturen das Wachstum bestimmter Zellen messen zu können, wurden die Zellen in den Versuchen mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) gefärbt. Dies ist ein Farbstoff, der durchflusszytometrisch gemessen werden kann und pro Teilung an Intensität verliert. Je mehr sich die Zellen teilen, desto weniger sind die Zellen mit Farbstoff gesättigt.

Für die Färbung mit CFSE wurden die sich im Nährmedium befindlichen Zellen zunächst 5min bei 1500rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml sterilem

PBS resuspendiert. 1 µl CFSE (5mM) wurde in 3 ml PBS gegeben und vermischt. Anschließend wurde davon 1 ml genommen und auf die Zellen gegeben und für 5 min im Dunklen belassen. Danach wurde die Färbung mit 5 ml Nährmedium gestoppt, 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und mit Nährmedium aufgefüllt.

2.2.8.3 In vitro Kultur der Treg-Zellen

Die durch magnetische Zellseparation isolierten Tregs wurden für 6 Tage in 96-Well-Platten in Nährmedium mit verschiedenen Stimuli kultiviert. Die Zellzahl betrug dabei zwischen 10.000 und 20.000 Zellen pro Well.

Zur Aktivierung der T-Zellen erfolgte eine Kostimulation mit löslichen Antikörpern anti-CD3 (c = 1 µg/ml) und anti-CD28 (c = 0,5 µg/ml). Dabei dienten beide Stimulatoren dazu, die Zellen zu aktivieren und sie für eine Differenzierung durch andere Zytokine zugänglich zu machen.[85] [86]

Als Stimuli wurden die in Tabelle 11 zusammengefassten Ansätze gewählt mit den in Tabelle 12 dargestellten Konzentrationen.

Tabelle 11: Verschiedene Stimuli bei der in-vitro Kultur von Treg-Zellen

	Stimuli	Beschreibung
1 Ansatz	Nährmedium ohne Kostimulation	Negative Kontrolle
2. Ansatz	Nährmedium	Positive Kontrolle
3 Ansatz	IL-17	IL-17
4 Ansatz	anti-IL-17	anti-IL-17
5 Ansatz	IL1β, IL-17, IL-23, IL-6	Th17-induzierender Cocktail
6 Ansatz	Secukinumab	Medikament

Tabelle 12: Konzentrationen der einzelnen Stimuli

Stimuli	Konzentrationen
IL-17	50 ng/ml
anti-IL-17	10 µg/ml
Secukinumab	10,2 µg/ml
IL1-β	10 ng/ml

Stimuli	Konzentrationen
TGF-β	5 ng/ml
IL-23	100 ng/ml
Il-6	20 ng/ml

2.2.8.4 Suppressionsversuch mit Tregs

Für den Suppressionsversuch der Tregs wurden PBMCs zusammen mit Tregs kultiviert, um den Einfluss der Tregs auf die Proliferation der PBMCs zu untersuchen.

Dafür wurden die PBMCs, wie oben beschrieben, mit CFSE markiert, um damit die Proliferation durchflusszytometrisch messen zu können. Die Tregs wurden aus den PBMCs mittels MACS isoliert. Anschließend wurden je 30.000 PBMCs zusammen unter Kostimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 sowie den obigen Stimulationen und Nährmedium in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurde ein Ansatz ebenfalls mit den gleichen Stimulationen und Kostimulation gemacht, welcher neben den 30.000 PBMC auch 30.000 Tregs beinhaltet. Die Proliferation der beiden Ansätze mit den jeweiligen Stimulatoren wurde in der Auswertung miteinander verglichen und daraus die Fähigkeit der Tregs zur Inhibition ermittelt. In Abbildung 14 ist das Schema des Suppressionsversuches grafisch dargestellt. Die Formel zur Errechnung der Inhibition lautet wie folgt:

$$\text{Inhibition in \%} = 1 - \frac{\text{Proliferation PBMCs in Kultur mit Tregs} \times 100}{\text{Proliferation PBMCs}}$$

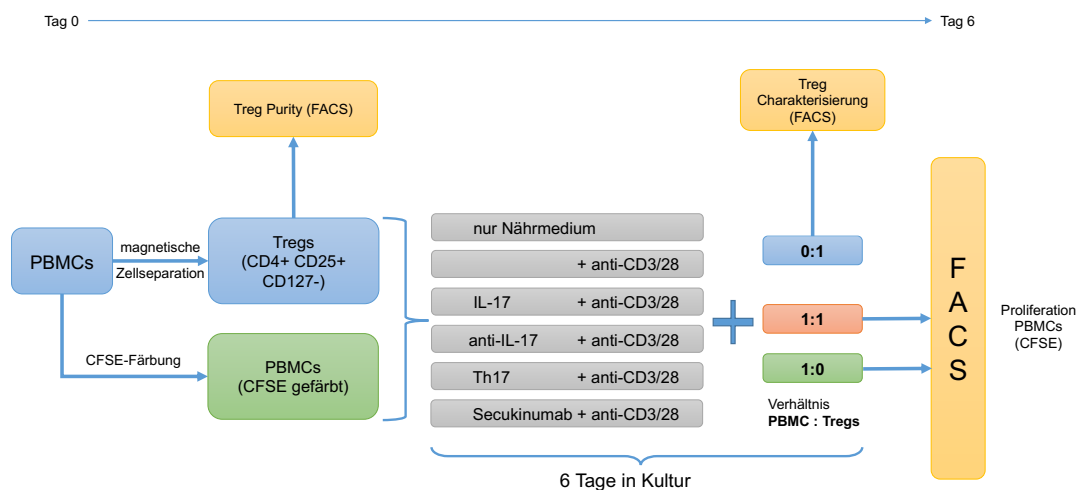


Abbildung 14: Schema Suppressionsversuch und Treg-Charakterisierung.

PBMCs werden an Tag 0 aufgeteilt. Ein Teil wird für die Kultur mit CFSE gefärbt, aus dem anderen Teil werden durch MACS-Separation Tregs isoliert. Anschließend erfolgt die Kultivierung einzeln und gemeinsam unter verschiedenen Stimulationen. An Tag 6 erfolgt die Messung mittels FACS.

2.2.8.5 Suppressionsversuch mit Tregs und gleichzeitig Secukinumab

Als weiterführender Versuch wurde der Versuch mit dem gleichen Aufbau wiederholt. Lediglich die Stimulationen wurden angepasst. Es wurde als Stimulation der Th17-induzierende Cocktail und der Th17-induzierende Cocktail zusammen mit Secukinumab gewählt (s. Tabelle 13). Die Auswertung erfolgte auf die gleiche Weise wie bei dem vorherigen Suppressionsversuch.

Tabelle 13: Ansätze und Stimuli

	Stimuli
1. Ansatz	Nährmedium
2 Ansatz	IL1 β , IL-17, IL-23, IL-6
3 Ansatz	IL1 β , IL-17, IL-23, IL-6 + Secukinumab

2.2.8.6 Suppressionsversuch mit Th17-stimulierten Tregs

Für den dritten Suppressionsversuch wurden zunächst PBMCs aufgetaut und aus einem Teil dieser mittels MACS Tregs isoliert. Die Hälfte der Tregs wurde für 3 Tage in Kultur mit dem Th17-induzierenden Cocktail gelassen, der andere Teil für 3 Tage in Nährmedium zusammen mit IL-2 (1 ng/ml) inkubiert. Danach wurden die unstimulierten und stimulierten Tregs jeweils mit den CFSE markierten PBMCs in Kultur gegeben. Als Stimulation wurde für einen Ansatz nur anti-CD3 und anti-CD28, für den anderen Ansatz zusätzlich Secukinumab dazugegeben.

Nach weiteren 4 Tagen wurden die Zellen intra- und extrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Die grafische Darstellung des Versuchs ist in Abbildung 15 dargestellt.

Die Berechnung der Inhibition erfolgte simultan über folgenden Rechenweg:

$$\text{Inhibition in \%} = 1 - \frac{\text{Proliferation PBMCs in Kultur mit Tregs} \times 100}{\text{Proliferation PBMCs ohne Tregs}}$$

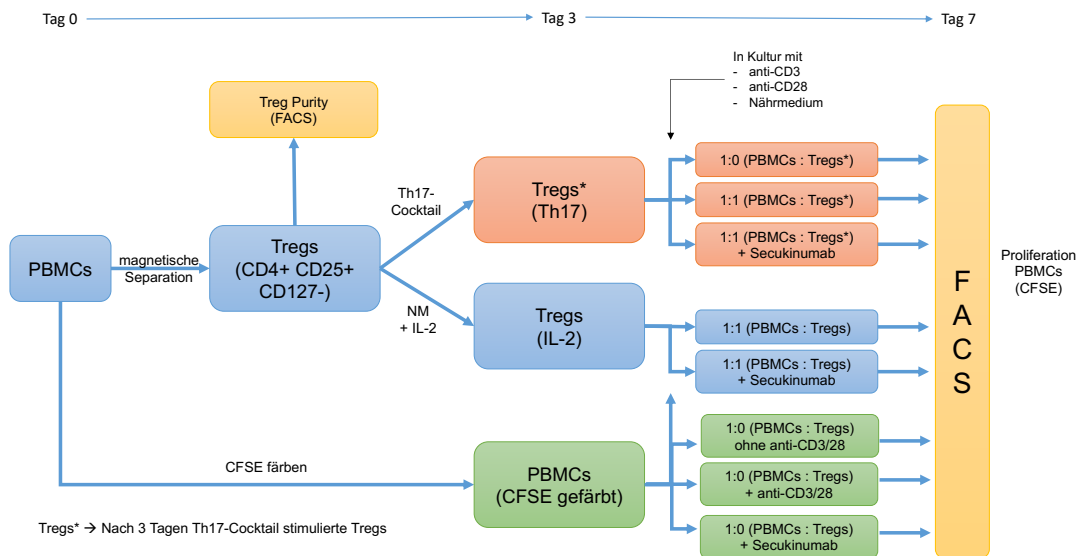


Abbildung 15: Suppressionsversuch mit zuvor stimulierten Tregs.

An Tag 0 erfolgt die MACS-Separation von Tregs. Anschließend werden die Tregs für 3 Tage zum einen Teil in Kultur mit Th17-Stimuli, zum anderen Teil mit IL-2 gebracht. Danach erfolgt die Kultivierung der stimulierten Tregs mit CFSE-gefärbten PBMCs für 4 Tage in Kultur mit und ohne Secukinumab. Am 7 Tag erfolgt die Messung der Proliferation der PBMCs mittels FACS.

2.2.9 Statistik

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten mit dem FACS Canto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), deren Auswertung mit der BD FACSDiva Software.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Analyse-Software IBM SPSS Statistics, Version 26 (Chicago, IL, USA). Die überwiegend nicht parametrischen, kontinuierlichen unverbunden Variablen wurden nach Testung der Normalverteilung durch den Kolmogorov-Smirnov-Test mittels Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Zur Signifikanzangabe wurde die berechnete exakte Signifikanz angegeben. Hierbei wurde das Signifikanzniveau mit $\alpha = 0,05$ gewertet.

Eine Korrektur des Typ I Fehlers durch multiples Testen erfolgte aufgrund des explorativen Charakters des Projektes nicht.

Die Grafiken wurden mit GraphPad Prism, Version 9 (San Diego, CA, USA), erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der T-Zellen von Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC)

3.1.1 Daten der gesamten Studienpopulation

In der Studienpopulation wurden 10 PSO im Vergleich zu 12 HC rekrutiert, wie in Tabelle 14 gezeigt. Das Alter der Patienten mit Psoriasis war mit durchschnittlich mit 53,7 Jahren höher als bei den gesunden Kontrollen mit 23,6 Jahren.

In Tabelle 15 werden die klinischen Parameter der Patienten dargestellt. Hier zeigte sich bei allen Patienten eine moderate Krankheitsaktivität mit einem durchschnittlichen PASI von 2,2 und keine laborchemische Erhöhung der Entzündungsparameter unter Therapie (CRP < 0,5mg/dl, Leukozyten < 10*10³/µl). Tabelle 16 und Tabelle 17 zeigen die Demografie von PSO und HC, sowie die klinischen Daten im Einzelnen aufgelistet.

Tabelle 14: Demografie der gesamten Studienpopulation

	PSO	HC
Anzahl an Proben	10	12
Anzahl an Männern	7 (70%)	8 (66,7%)
/ Frauen (in %)	3 (30%)	4 (33,3%)
Alter am Tag des Studieneinschlusses (Jahre)	53,7 ± 8,6 (52; 45-77)	23,6 ± 1,0 (23,5; 22-25)
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	34,2 ± 14,9 (32,5; 13-66)	
Dauer der Erkrankung (Jahre)	19,5 ± 9,6 (19; 3-36)	

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum). PSO = Psoriasis, HC = Gesunde Kontrolle)

Tabelle 15: Klinische Daten der Patienten mit Psoriasis

Apremilast (in therapeutischer Dosierung)	1 (10%)		
Fumarsäure	1 (10%)		
Ciclosporin (200mg/Tag)	1 (10%)		
Methotrexat (10-20 mg/m²/Woche)	4 (40%)		
Biologika (in therapeutischer Dosierung)	6 (60%)	Adalimumab	2 (20%)
		Ustekinumab	2 (20%)
		Secukinumab	2 (20%)
PASI (Psoriasis Area and Severity Index)	2,2 ± 2,4 0,9; (0,0-6,6)		
CRP (C-reaktives Protein) (mg/dl)	0,3 ± 0,29 0,2; (0,04-0,4)		
Leukozyten x10³ /µl (Normwert 4.8-10)	7,1 ± 2,0 6,7; (4,9-11,1)		
Lymphozyten x10³ /µl (Normwert 1-4.05)	1,6 ± 0,7 1,4; (0,7-3,3)		
Lymphozyten in %	22,0 ± 6,3 20,0; (14-37)		
Thrombozyten x10³ /µl (Normwert 150-450)	250 ± 46 261; (178-317)		
Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum).			

Tabelle 16: Klinische Daten und Demografie einzelner PSO.

	Geschlecht	Alter bei Studien-einschluss (Jahre)	Alter bei Erst-diagnose (Jahre)	Dauer der Erkrankung (Jahre)	Therapie bei Studien-einschluss
PSO1	männlich	54	29	25	Ciclosporin, Secukinumab
PSO2	männlich	54	36	18	Methotrexat, Apremilast
PSO3	männlich	48	29	19	Secukinumab
PSO4	männlich	55	46	9	Adalimumab
PSO5	männlich	77	66	11	Methotrexat
PSO6	weiblich	47	44	3	Methotrexat, Adalimumab
PSO7	männlich	50	14	36	Fumarsäure
PSO8	männlich	57	38	19	Ustekinumab
PSO9	weiblich	50	27	23	Methotrexat
PSO10	weiblich	45	13	32	Ustekinumab

	PASI	CRP (mg/dl)	Leuko-zyten (x10³ /µl)	Lympho-zyten (x10³ /µl)	Lympho-zyten (in %)	Thrombozyten (x10³ /µl)
PSO1	6,60	0,9	7,80	1,35	17	275
PSO2	4,8	n.a.	9,7	1,78	18	277
PSO3	5,8	0,26	7,9	1,61	20	203
PSO4	0,8	0,14	5,6	1,07	19	218
PSO5	0	n.a.	6	1,27	21	195
PSO6	0,5	0,04	11,1	3,3	30	317
PSO7	0,5	n.a.	4,9	0,96	20	284
PSO8	0,5	0,07	7,4	1,52	21	301
PSO9	1,7	n.a.	5,6	2,05	37	246
PSO10	1	0,41	5,00	0,68	14	178

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum). PSO = Psoriasis, HC = Gesunde Kontrolle).

Tabelle 17: Demografie der HC.

	Geschlecht	Alter bei Studieneinschluss (Jahre)
HC1	männlich	22
HC2	männlich	23
HC3	weiblich	25
HC4	weiblich	23
HC5	männlich	22
HC6	männlich	25
HC7	männlich	24
HC8	männlich	23
HC9	weiblich	24
HC10	männlich	23
HC11	männlich	25
HC12	weiblich	24

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen. PSO = Psoriasis, HC = Gesunde Kontrolle)

3.1.2 Studienpopulation der Spender von unstimulierten PBMCs

In Tabelle 18 und Tabelle 19 werden die Demografie und die klinischen Daten der Patientenkohorte und Kontrollkohorte in den Versuchen der unstimulierten PBMCs dargestellt.

Tabelle 18: Demografie der Spender von unstimulierten PBMCs.

	PSO	HC
Anzahl an Proben	4	5
Anzahl an Männern	3 (75%)	4 (80%)
/ Frauen (in %)	1 (25%)	1 (20%)
Alter am Tag des Studieneinschlusses (Jahre)	58,3 ± 11,3 (54,5; 47-77)	24,2 ± 0,8 (24,0; 23-25)
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	46,3 ± 13,2 (45,0; 29-66)	
Dauer der Erkrankung (Jahre)	12,0 ± 8,1 (10,0; 3-25)	

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum). PSO = Psoriasis, HC = Gesunde Kontrolle)

Tabelle 19: Klinische Daten der Spender von unstimulierten PBMCs

Ciclosporin (200mg/Tag)	1 (25%)		
Methotrexat (10-20 mg/m²/Woche)	2 (50%)		
Biologika (in therapeutischer Dosierung)	3 (75%)	Adalimumab	2 (50%)
		Secukinumab	1 (25%)
PASI (Psoriasis Area and Severity Index)	2,0 ± 2,7		
	0,7; (0,0-6,6)		
CRP (C-reaktives Protein) (mg/dl)	0,4 ± 0,4		
	0,1; (0,0-0,9)		
Leukozyten x10³ /µl (Normwert 4.8-10)	7,6 ± 2,2		
	6,9; (5,6-11,1)		
Lymphozyten x10³ /µl (Normwert 1-4.05)	1,8 ± 0,9		
	1,3; (1,1-1,3)		
Lymphozyten in %	21,8 ± 4,8		
	20,1; (17-30)		
Thrombozyten x10³ /µl (Normwert 150-450)	251,3 ± 47,9		
	247; (195-317)		

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum).

3.1.3 Prozentuale Verteilung der Lymphozyten

In Tabelle 21 werden die Subpopulationen der PBMCs zwischen den Studienpopulationen im Detail verglichen. Tabelle 20 stellt die Definition der unterschiedlichen Populationen anhand derer Oberflächenmarker dar. In Abbildung 50 finden sich die zugehörigen Dot Blots.

Bei HC waren CD4⁺ naiven-Th-Zellen signifikant erhöht im Vergleich zu PSO. Auch von CD8⁺ naiven-T-Zellen konnte eine erhöhte Anzahl in HC nachgewiesen werden. Im Gegenzug waren die Memory-T-Zellen, auch Gedächtniszellen genannt, und Effektor-T-Zellen bei PSO im Vergleich zu HC erhöht. TEMRA-Zellen zeigten innerhalb der CD4⁺-Zellen keinen Unterschied. Innerhalb der CD8⁺-Zellen war eine nicht signifikante Erhöhung innerhalb der HC im Vergleich zum PSO zu erkennen.

Tabelle 20: Oberflächenmarker der T-Zell Subpopulationen.

T-Zell Subpopulation	CD45RA ⁺	CD45RA ⁻
CD27 ⁺	Naive	Memory
CD27 ⁻	TEMRA	Effektor

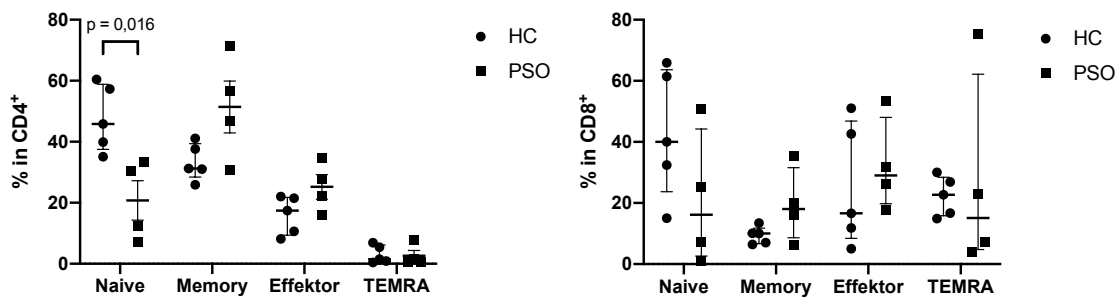


Abbildung 16: T-Zellpopulationen in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Prozentualer Anteil der Subpopulationen in den CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte (p<0,05) dargestellt. HC = gesunde Kontrollen, PSO = Psoriasis.

3.1.3.1 Oberflächenmarker CCR6, CXCR3 und CCR7

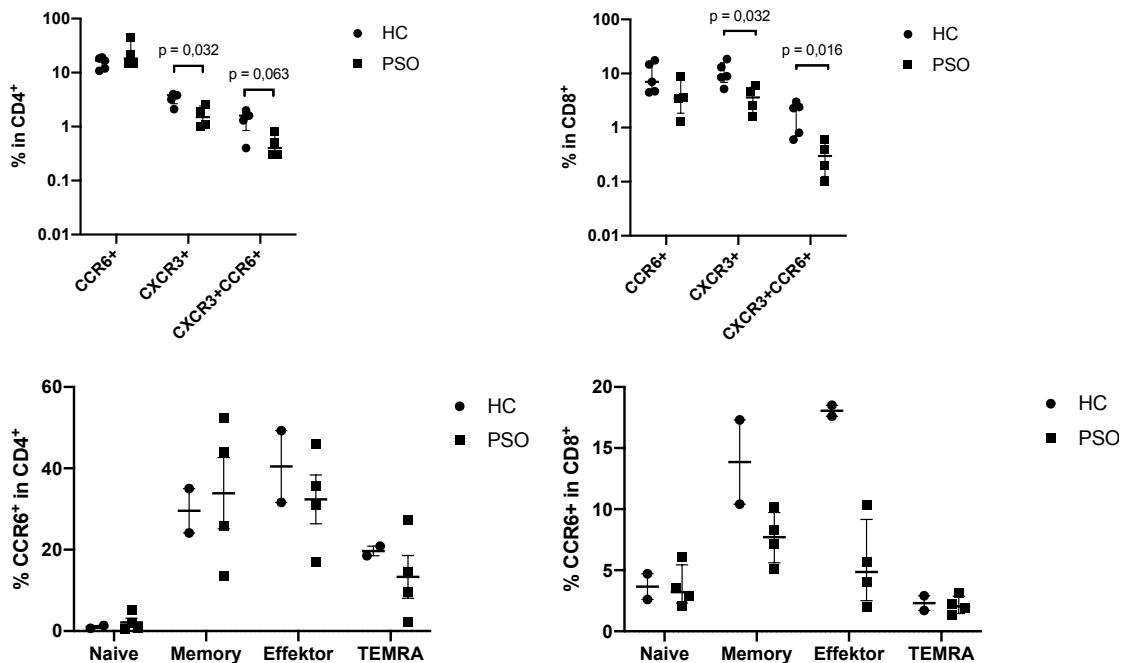
Sowohl in CD8⁺-T-Zellen als auch in CD4⁺-T-Zellen konnte in HC ein signifikant erhöhter Anteil an CXCR3⁺-Zellen festgestellt werden. Innerhalb der CD8⁺-T-Zellen zeigte sich auch die Population der CXCR3⁺CCR6⁺-Zellen signifikant erhöht. In der Expression von CCR6⁺-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Im Vergleich der Subpopulationen konnte eine CCR6-Expression insbesondere in Memory- und Effektor-Zellen gezeigt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen PSO und HC ergab sich nicht (s. Abbildung 17).

CXCR3⁺-Zellen zeigten sich in der Gruppe der T-Zellen abgesehen von naiven Lymphozyten in HC im Vergleich zu PSO tendenziell erhöht.

In der Expression von CCR7 konnte zwischen beiden Populationen kein signifikanter Unterschied bei naiven und Effektor-Zellen dargestellt werden, auch wenn sich bei CD4⁺-Zellen verhältnismäßig bei dem Kollektiv der Patienten mit Psoriasis eine höhere Expression von CCR7-Zellen zeigte.

Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 50 dargestellt.



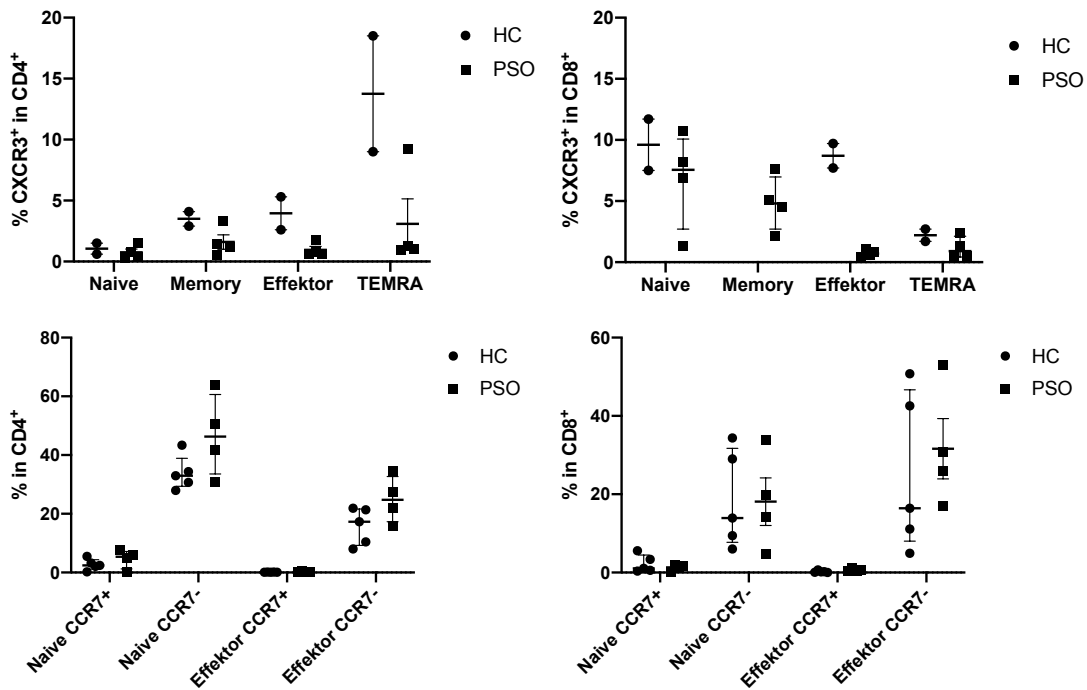


Abbildung 17: CCR6, CXCR3, CCR7 in CD4+ und CD8+ T-Zellpopulationen.

Prozentualer Anteil der CCR6-, CXCR3- und CCR7-Expression in den CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrollen, PSO = Psoriasis.

3.1.3.2 Produktion von GranzymB und Perforin

Die Zytotoxizität der T-Zellen in Form von Expression von Perforin und GranzymB fand sich sowohl bei CD4⁺-Zellen als auch bei CD8⁺-Zellen, vor allem in Effektor-Zellen und TEMRA (s. Abbildung 18 und Tabelle 21)

In CD4⁺ TEMRA- und Effektor-Zellpopulationen konnte eine erhöhte Anzahl an Perforin⁺-Zellen und GranzymB⁺-Zellen nachgewiesen werden (nicht signifikant). In naiven und Memory-Zellen konnte kaum eine Expression gezeigt werden.

In CD8⁺ Zellpopulationen zeigte sich bei PSO im Vergleich zu HC eine geringe Expression von GranzymB und Perforin auch in naiven Zellen. Ein Unterschied zwischen HC und PSO konnte in der Zellpopulation der Effektor- und TEMRA-Zellen nicht nachgewiesen werden. Die zugehörigen Dot Blots sind in der Abbildung 50 dargestellt.

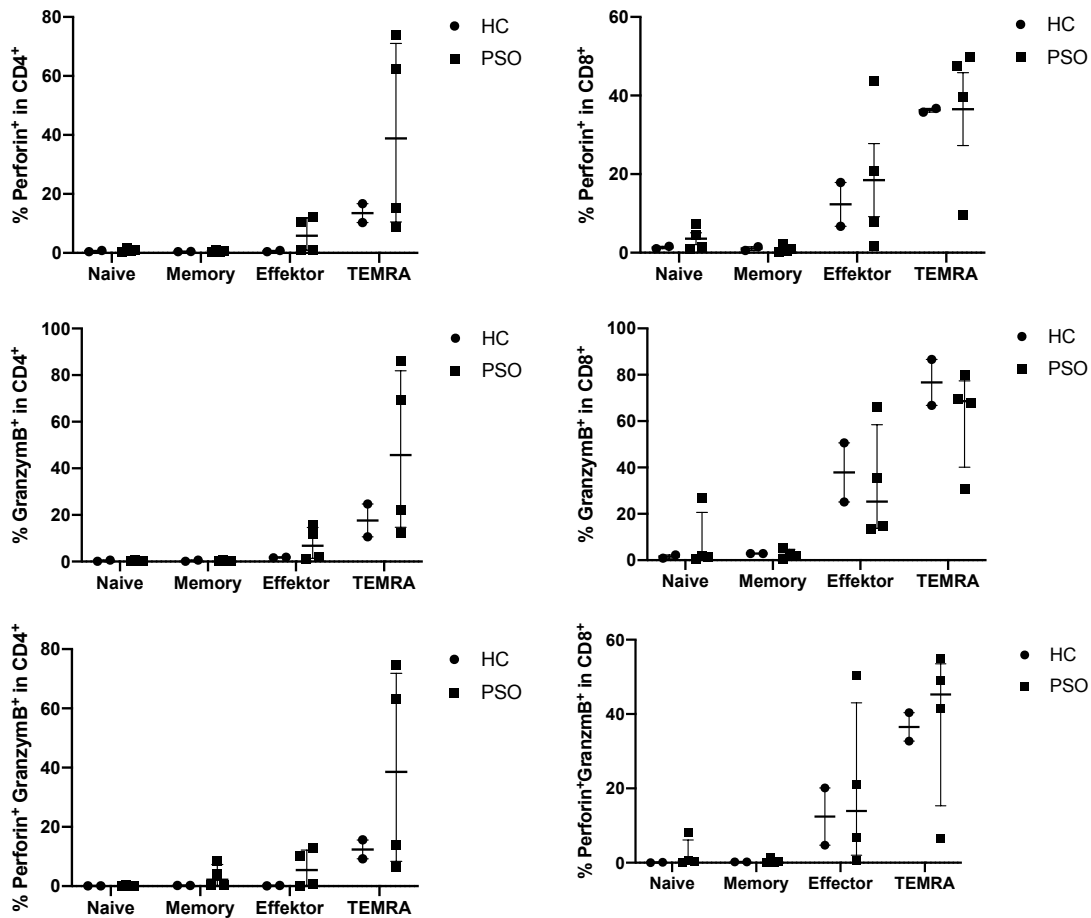


Abbildung 18: Produktion von Perforin und GranzymB in T-Zell-Subpopulationen.

Prozentualer Anteil der Perforin- und GranzymB-Expression in den Subpopulationen der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte (p<0,05) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Tabelle 21: Prozentuale Verteilung der T-Zell Subpopulationen in CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen.

	CD4 ⁺			CD8 ⁺			
	% in CD4 ⁺ /CD8 ⁺	PSO	HC	P-Wert	PSO	HC	p-Wert
Naive		20,8 ± 13,0 (21,3; 7,1-33,3)	47,7 ± 10,9 (45,8; 35,1-60,4)	0,016	21,0 ± 22,2 (16,2; 1,1-50,6)	42,9 ± 21,0 (40,0; 15,0-65,9)	0,190
Memory		51,4 ± 17,0 (51,7; 30,9-71,4)	33,4 ± 6,0 (31,2; 25,9-41,1)	0,190	19,4 ± 12,2 (18,1; 6,1-35,4)	9,4 ± 2,8 (10,0; 6,4-13,4)	0,286
Effektor		25,2 ± 8,0 (25,1; 15,9-34,7)	15,9 ± 6,3 (17,4; 8,2-22,0)	0,111	32,3 ± 15,2 (29,1; 17,6-53,4)	25,4 ± 29,2 (16,6; 5,0-51,0)	0,413
TEMRA		2,6 ± 3,5 (1,2; 0,4-7,8)	3,0 ± 2,9 (1,5; 0,4-6,9)	0,905	27,4 ± 33,0 (15,1; 4-75,2)	22,3 ± 6,5 (22,7; 14,9-30,0)	0,730

CCR6⁺ Naive	2,1 ± 2,1 (1,4; 0,6-5,2)	1,1 ± 0,5 (1,1; 0,7-1,4)	0,800	3,7 ± 1,7 (3,2; 2,1-6,1)	3,7 ± 1,5 (3,7; 2,6-4,7)	1,000
CCR6⁺ Memory	33,9 ± 17,6 (35,0; 13,4-52,3)	29,6 ± 7,7 (29,6; 24,1-35,0)	0,800	7,7 ± 2,1 (7,7; 5,1-10,2)	13,9 ± 4,9 (13,9; 10,4-17,3)	0,133
CCR6⁺ Effektor	32,4 ± 12,0 (33,3; 17,0-45,9)	40,5 ± 12,5 (40,5; 31,6-49,3)	0,533	5,5 ± 3,5 (4,9; 2,0-10,3)	18,1 ± 0,6 (18,1; 17,6-18,5)	0,133
CCR6⁺ TEMRA	13,3 ± 10,5 (12,0; 2,1-27,2)	19,7 ± 1,7 (19,7; 18,5-20,9)	0,533	2,1 ± 0,8 (2,1; 1,3-3,1)	2,3 ± 0,8 (2,3; 1,7-2,9)	1,000
CXCR3⁺ Naive	0,8 ± 0,5 (0,6; 0,3-1,5)	1,1 ± 0,6 (1,1; 0,6-1,5)	0,533	6,8 ± 4,0 (7,6; 1,3-10,7)	9,6 ± 3,0 (9,6; 7,5-11,7)	0,533
CXCR3⁺ Memory	1,2 ± 0,9 (0,9; 0,4-2,4)	2,2 ± 0,7 (2,2; 1,7-2,7)	0,267	4,8 ± 2,3 (4,8; 2,1-7,6)	40,8 ± 26,1 (40,8; 22,3-59,2)	0,133
CXCR3⁺ Effektor	1,0 ± 0,6 (0,7; 0,6-1,8)	4,0 ± 1,9 (4,0; 2,6-5,3)	0,133	0,7 ± 0,3 (0,7; 0,4-1,1)	8,7 ± 1,4 (8,7; 7,7-9,7)	0,133
CXCR3⁺ TEMRA	3,1 ± 4,1 (1,2; 0,9-9,2)	13,8 ± 6,7 (13,8; 9,0-18,5)	0,267	1,2 ± 0,9 (0,9; 0,4 -2,4)	2,2 ± 0,7 (2,2; 1,7-2,7)	0,267
CCR7⁺ Naive	4,6 ± 3,2 (5,4; 0,1-7,6)	2,7 ± 1,9 (2,4; 0,3-5,5)	0,413	1,3 ± 0,7 (1,6; 0,2-1,9)	2,2 ± 2,3 (1,1; 0,4-5,6)	0,905
CCR7⁺ Naive	46,8 ± 14,0 (46,3; 30,8-63,9)	33,9 ± 5,8 (33,0; 28,9-43,4)	0,190	18,1 ± 12,2 (17,0; 4,6-33,8)	18,6 ± 12,5 (14,0; 6,0-34,4)	1,099
CCR7⁺ Effektor	0,3 ± 0,1 (0,3; 0,2-0,4)	0,1 ± 0,0 (0,1; 0,1-0,2)	0,063	0,6 ± 0,3 (0,6; 0,4-1,1)	0,2 ± 0,3 (0,2; 0,0-0,7)	0,063
CCR7⁺ Effektor	24,9 ± 8,0 (24,8; 15,7-34,4)	15,8 ± 6,3 (17,3; 8,0-21,9)	0,111	31,6 ± 15,4 (28,3; 16,9-53,0)	25,2 ± 20,3 (16,4; 4,9-50,8)	0,413
Perforin⁺ naive	0,8 ± 0,6 (0,7; 0,3-1,6)	0,6 ± 0,3 (0,6; 0,4-0,8)	0,800	3,6 ± 3,0 (3,0; 1,0-7,3)	1,3 ± 0,4 (1,3; 1,0-1,6)	0,533
Perforin⁺ Memory	0,6 ± 0,4 (0,6; 0,3-1,1)	0,5 ± 0,1 (0,5; 0,4-0,5)	0,800	0,9 ± 0,8 (0,7; 0,3-2,1)	1,1 ± 0,6 (1,1; 0,6-1,5)	0,800
Perforin⁺ Effektor	6,2 ± 6,1 (5,9; 0,8-12,3)	0,6 ± 0,3 (0,6; 0,4-0,8)	0,133	18,5 ± 18,6 (14,4; 1,6-43,6)	12,3 ± 7,9 (12,3; 6,7-17,9)	0,800
Perforin⁺ TEMRA	40,1 ± 32,8 (38,8; 8,9-73,9)	7,7 ± 2,3 (7,7; 6,1-9,3)	0,800	36,6 ± 18,6 (43,5; 9,5-49,5)	36,3 ± 0,6 (36,3; 35,8-36,7)	0,533
Granzym⁺ naive	0,4 ± 0,4 (0,3; 0,1-0,9)	0,4 ± 0,4 (0,4; 0,1-0,9)	0,800	7,7 ± 12,8 (1,6; 0,6-26,9)	1,6 ± 1,0 (1,6; 0,9-2,3)	1,000
Granzym⁺ Memory	0,3 ± 0,2 (0,2; 0,1-0,6)	0,4 ± 0,4 (0,4; 0,1-0,6)	0,800	2,6 ± 2,1 (2,3; 0,4-5,4)	2,9 ± 0,0 (2,9; 2,9-2,9)	0,533
Granzym⁺ Effektor	7,6 ± 7,2 (6,8; 1,2-15,6)	1,8 ± 0,2 (1,8; 1,6-1,9)	0,533	32,5 ± 24,6 (25,3; 13,3-66,1)	37,9 ± 18,0 (37,9; 25,1-50,6)	0,800
Granzym⁺ TEMRA	47,4 ± 35,8 (45,7; 12,2-86,1)	17,7 ± 10,0 (17,7; 10,6-24,7)	0,800	62,1 ± 21,5 (68,7; 30,9-80,0)	76,7 ± 14,0 (76,7; 66,8-86,6)	0,800

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-test verglichen.

3.1.4 Expression von Chemokinrezeptoren

In unserer Studienpopulation zeigten sich signifikant höhere Expression von Th17-Zellmarkern wie CD161 und CCR6 in HC im Vergleich zu PSO in CD4⁺-Zellen. Die Expression von CD161 fand sich auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis innerhalb einer Subgruppe von nicht-klassischen Th1-Zellen, welche eine erhöhte Plastizität zu Th17-Zellen haben [87]. In CD8⁺-Zellen zeigten sich diese Marker erhöht, jedoch nicht signifikant (Vgl. Abbildung 19, Tabelle 22 und Abbildung 50).

Tabelle 22: Chemokine in CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen.

	CD4 ⁺		P-Wert	CD8 ⁺		p-Wert
	PSO	HC		PSO	HC	
CD161⁺	1,9 ± 1,2 (1,9; 0,5-3,3)	6,6 ± 2,8 (5,9; 4,8-11,5)	0,016	1,6 ± 0,6 (1,7; 0,7-2,2)	2,3 ± 1,7 (1,7; 1,2-5,3)	0,905
CCR6⁺	23,9 ± 14,0 (18,3; 14,5-44,3)	15,3 ± 3,8 (16,6; 10,8-19,1)	0,413	4,3 ± 3,2 (3,6; 1,3-8,8)	9,7 ± 6,1 (7,0; 0,8-3,1)	0,111
CD161⁺ CCR6⁺	1,3 ± 1,0 (1,0; 0,4-2,7)	4,3 ± 2,3 (3,2; 2,6-8,2)	0,032	0,5 ± 0,4 (0,5; 0,1-1,1)	1,4 ± 1,0 (1,0; 0,8-3,1)	0,111
CXCR3⁺	1,7 ± 0,8 (1,5; 1,0-2,6)	3,4 ± 0,8 (3,8; 2,1-4,0)	0,032	3,7 ± 1,9 (3,6; 1,6-5,9)	10,9 ± 5,2 (8,9; 5,2-18,6)	0,032
CXCR3⁺ CCR6⁺	0,5 ± 0,2 (0,4; 0,3-0,8)	1,4 ± 0,6 (1,6; 0,4-2,0)	0,063	0,3 ± 0,2 (0,3; 0,1-0,6)	1,8 ± 1,1 (2,3; 0,6-3,0)	0,016

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

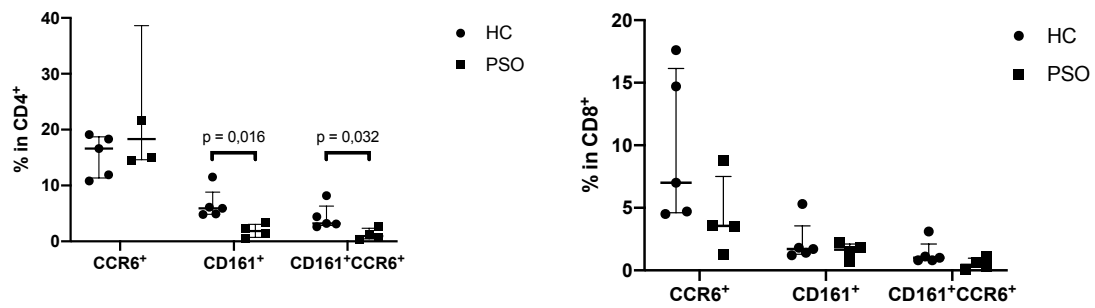


Abbildung 19: Chemokinrezeptoren in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

Prozentualer Anteil der Chemokinrezeptoren in den Subpopulationen der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.1.5 Intrazelluläre Zytokinproduktion

Die prozentualen Werte der Zytokin-produzierenden Zellen aufgeteilt in CD4⁺ und CD8⁺ und deren Subpopulationen werden in Tabelle 23 aufgeführt sowie in Abbildung 20 und Abbildung 50 als Dot Blots grafisch dargestellt. Im Vergleich zu PSO zeigten sich bei HC erhöhte Werte von IL-17, IFN γ und TNF α sowohl in CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen. In der Subpopulation von CCR6⁺ und CD161⁺ CD4⁺-Zellen waren die Unterschiede bei IL-17 und IFN γ signifikant. In der Population der CD8⁺-Zellen konnte eine signifikante Erhöhung von IFN γ bei CCR6⁺-Zellen nachgewiesen werden.

Tabelle 23: Zytokine in CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen und Subpopulationen

% in	CD4 ⁺		P-Wert	CD8 ⁺		P-Wert
	PSO	HC		PSO	HC	
TNFα	1,0 ± 0,7 (0,8; 0,4-2,0)	1,1 ± 0,6 (1,1; 0,6-1,5)	0,800	2,5 ± 2,3 (1,8; 0,7-5,6)	3,1 ± 1,1 (3,1; 2,3-3,9)	0,800
IFNγ	5,0 ± 3,9 (3,5; 2,3-10,8)	7,1 ± 3,5 (6,5; 3,7-11,8)	0,286	17,2 ± 11,2 (12,8; 9,7-33,6)	33,1 ± 16,2 (33,7; 13,8-53,6)	0,111
IL-17	0,8 ± 0,4 (0,8; 0,3-1,1)	1,4 ± 0,6 (1,2; 0,9-2,3)	0,111	0,6 ± 0,3 (0,5; 0,3-1,0)	1,0 ± 0,4 (1,1; 0,4-1,4)	0,111
IFNγ + IL-17	0,8 ± 0,4 (0,8; 0,3-1,1)	1,4 ± 0,6 (1,2; 0,9-2,3)	0,111	0,1 ± 0,0 (0,1; 0,1-0,1)	0,3 ± 0,2 (0,2; 0,1-0,6)	0,063
	CD4 ⁺ CCR6 ⁺			CD8 ⁺ CCR6 ⁺		
TNFα	1,0 ± 0,7 (0,8; 0,4-2,0)	1,1 ± 0,6 (1,1; 0,6-1,5)	0,800	4,6 ± 2,8 (3,8; 2,3-8,6)	4,7 ± 3,4 (4,7; 2,3-7,1)	1,000
IFNγ	1,5 ± 1,1 (1,4; 0,5-2,7)	15,1 ± 6,7 (15,8; 6,5-24,9)	0,016	18,9 ± 4,0 (20,1; 13,1-22,2)	34,9 ± 8,6 (36,4; 25,3-43,0)	0,016
IL-17	1,6 ± 0,2 (1,5; 1,3-1,9)	5,1 ± 1,2 (5,7; 3,2-6,1)	0,016	1,8 ± 2,1 (1,7; 0,0-3,9)	5,6 ± 4,3 (4,8; 0,0-10,4)	0,286
IFNγ + IL-17	0,2 ± 0,3 (0,2; 0,0-0,6)	0,8 ± 0,6 (0,8; 0,1-1,7)	0,111	0,4 ± 0,3 (0,5; 0,0-0,6)	1,0 ± 0,7 (0,9; 0,2-1,7)	0,413
	CD4 ⁺ CD161 ⁺			CD8 ⁺ CD161 ⁺		
TNFα	0,0 ± 0,0 (0,0; 0,0-0,0)	2,7 ± 1,2 (2,7; 1,9-3,6)	0,133	2,2 ± 3,0 (1,3; 0,0-6,3)	6,2 ± 1,3 (6,2; 5,3-7,1)	0,267
IFNγ	2,5 ± 3,4 (1,5; 0,0-7,1)	24,0 ± 6,4 (26,8; 16,7-30,3)	0,016	23,8 ± 16,1 (19,4; 9,5-46,7)	54,6 ± 18,4 (46,2; 35,0-77,3)	0,111

IL-17	0,8 ± 1,5 (0,0; 0,0-3,03)	5,7 ± 1,5 (5,7; 3,8-8,0)	0,016	1,3 ± 2,6 (0,0; 5,26)	2,9 ± 2,6 (1,9; 0-6,3)	0,286
IFNγ + IL-17	0,2 ± 0,3 (0,1; 0,0-0,7)	1,0 ± 0,7 (1,5; 0,1-1,5)	0,111	0,3 ± 0,24 (0,4; 0,0-0,5)	0,6 ± 0,8 (0,0; 0,0-1,6)	0,905

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte \pm Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

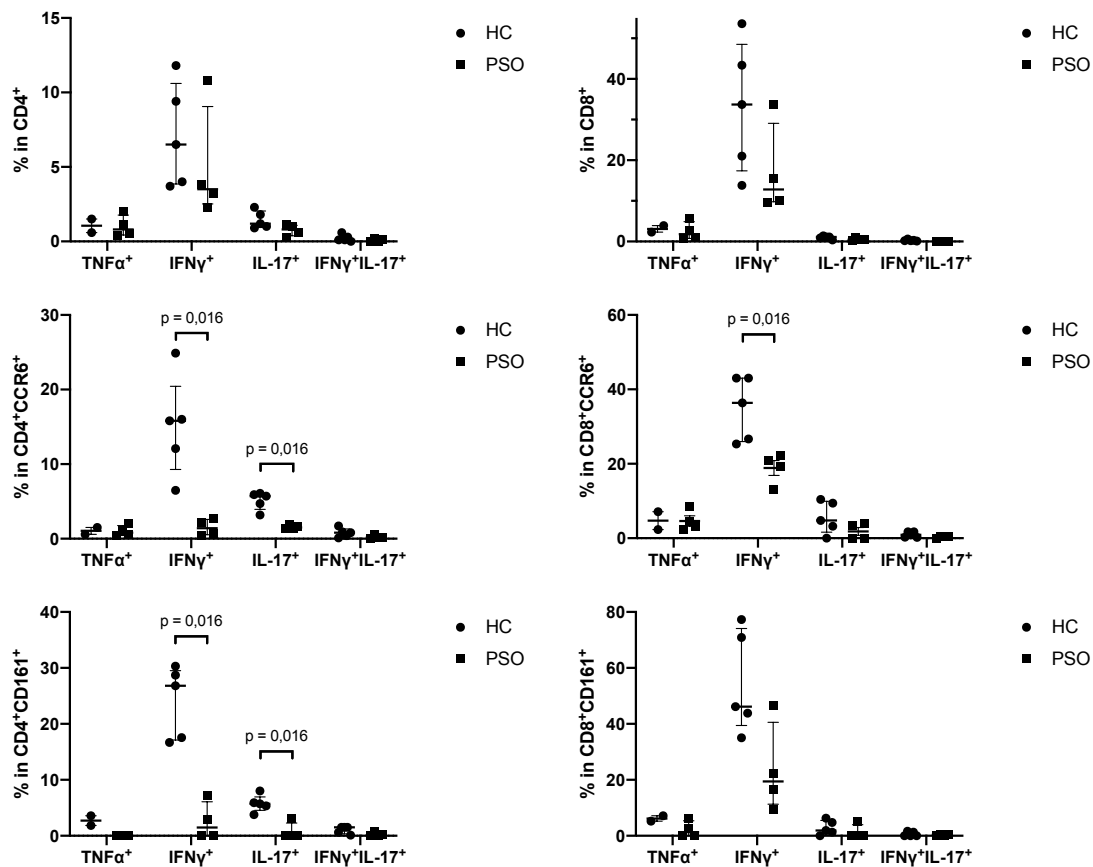


Abbildung 20: Zytokinproduktion in CD4+/CD8+ und Subpopulationen.

Prozentualer Anteil der Zytokinproduktion in den Subpopulationen der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte (p<0,05) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.1.6 Charakterisierung der Tregs

3.1.6.1 Charakteristika der Tregs (CD4⁺CD25⁺CD127⁻)

Tregs wurden in unserer Studie definiert als CD4⁺CD25⁺CD127⁻. Wie in Tabelle 24 und Abbildung 21 dargestellt, findet sich in HC eine leichte Erhöhung der FoxP3⁺-Zellen ohne Signifikanz. Ein signifikanter Unterschied der Anzahl an Tregs konnte im Vergleich von HC und PSO nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigt sich kein signifikanter Unterschied der FoxP3-Expression innerhalb der Tregs.

IL-10 wurde in HC in der Subpopulation der CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺-Zellen höher exprimiert (nicht signifikant). Bezüglich der Expression von IL-10 in CD4⁺Foxp3⁺-Zellen konnte kein Unterschied gezeigt werden. Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 51 dargestellt.

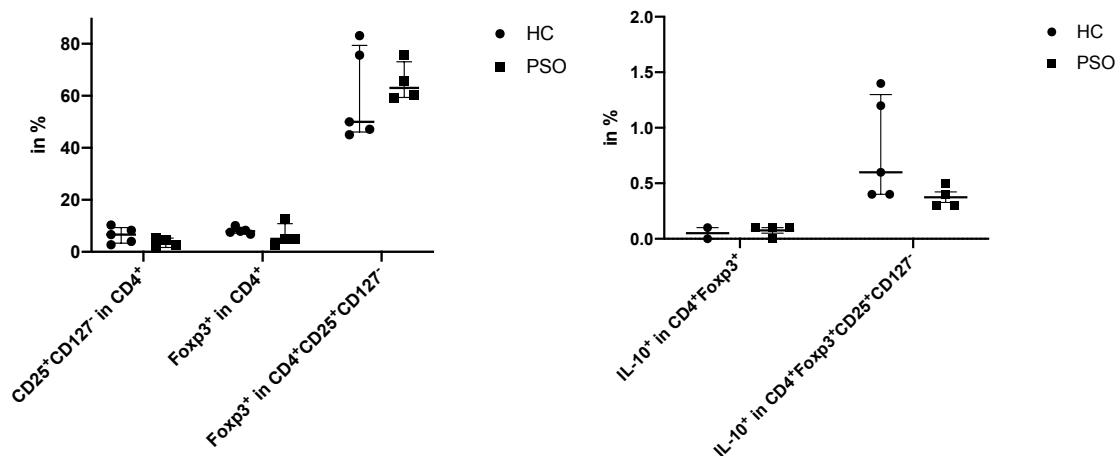


Abbildung 21: Treg-Charakterisierung in CD4⁺-Zellen

Prozentueller Anteil der Tregs innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und der FoxP3-Expression mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte (p<0,05) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.1.6.2 Charakteristika der CD4⁺CCR6⁺-T-Zellen

In Abbildung 22, Tabelle 24 und Abbildung 51 werden die Charakteristika der CD4⁺CCR6⁺-T-Zellen grafisch, tabellarisch und als Dot Blots dargestellt.

Innerhalb der leicht erhöhten Anzahl an CCR6⁺-Zellen bei PSO im Vergleich zu HC zeigte sich in der Expression von FoxP3 und IL-10 kein Unterschied. Die Subpopulation von CD4⁺Foxp3⁺CCR6⁺-Zellen wies eine leicht erhöhte IL-10 Produktion innerhalb der HC auf, wenn auch nicht signifikant.

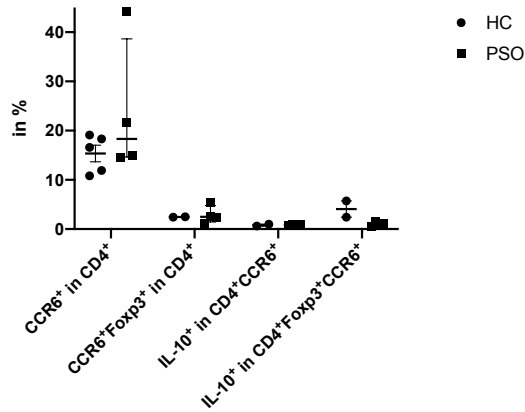


Abbildung 22: Charakterisierung in CD4⁺CCR6⁺-T-Zellen

Prozentualer Anteil der Expression von CCR6 und IL-10 in CD4⁺-Zellen und deren Subpopulationen mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte (p<0,05) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Tabelle 24: Charakteristika Treg und CCR6⁺-Zellen.

% in CD4 ⁺	PSO	HC	p-Wert
CD25 ⁺ CD127 ⁺	3,6 ± 1,9 (3,7; 1,4-5,5)	6,4 ± 3,1 (6,6; 2,7-10,3)	0,142
FoxP3 ⁺	6,3 ± 4,4 (5,0; 2,7-12,7)	8,1 ± 1,2 (7,9; 6,8-10,1)	0,286
FoxP3 ⁺ in CD25 ⁺ CD127 ⁻	65,2 ± 7,5 (63,0; 59,0-75,6)	60,1 ± 17,8 (50,0; 45,0-83,1)	0,556
IL-10 ⁺ in CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0-0,1)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0-0,1)	0,576
IL-10 ⁺ in FoxP3 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	0,4 ± 0,1 (0,4; 0,3-0,5)	0,8 ± 0,5 (0,6; 0,4-1,4)	0,111
FoxP3 ⁺ CCR6 ⁺	2,9 ± 1,9 (2,5; 1,1-5,5)	2,5 ± 0,1 (2,5; 2,4-2,5)	0,800
IL-10 ⁺ in FoxP3 ⁺ CCR6 ⁺	1,0 ± 0,4 (1,0; 0,5-1,5)	4,1 ± 2,3 (4,1; 2,4-5,7)	0,133
IL-10 ⁺ in CCR6 ⁺	0,88 ± 0,1 (0,9; 0,8-1,0)	0,8 ± 0,3 (0,8; 0,6-1,0)	0,812

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

3.1.6.3 Charakteristika der Treg/Th17-Zellen

Die Charakteristika der Treg/Th17-Zellen sind in Tabelle 25, Abbildung 23 und Abbildung 51 dargestellt.

In der Produktion von IL-17 zeigte sich in CD4⁺-Zellen kein relevanter Unterschied zwischen PSO und HC. In den Subgruppen CCR6⁺, CCR6⁺FoxP3⁺ und CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺ konnte eine erhöhte Expression von IL-17 bei PSO gezeigt werden (nicht signifikant). Ebenfalls zeigte sich tendenziell eine erhöhte Anzahl an CCR6⁺IL17⁺-Zellen im Vergleich zu HC.

In der Anzahl von ROR γ t⁺CD4⁺-Zellen und ROR γ t⁺FoxP3⁺CD4⁺-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

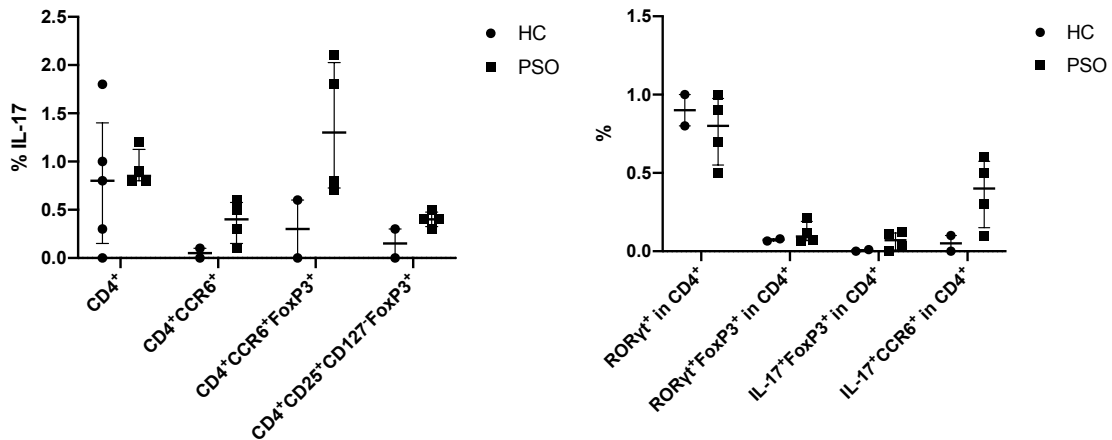


Abbildung 23: Charakteristika in Treg/Th17-Zellen.

Prozentualer Anteil der IL-17-Expression, sowie ROR γ t-Expression innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Tabelle 25: Charakteristika Treg/Th17-Zellen

% in CD4⁺	PSO	HC	p-Wert
IL-17⁺	0,9 ± 0,2 (0,9; 0,8-1,2)	0,8 ± 0,7 (0,8; 0,0-1,8)	0,618
IL-17⁺ in CCR6⁺	0,4 ± 0,2 (0,4; 0,1-0,6)	0,1 ± 0,2 (0,1; 0,1-0,6)	0,133
IL-17⁺ in FoxP3⁺CCR6⁺	1,4 ± 0,7 (1,3; 0,7-2,1)	0,3 ± 0,4 (0,3; 0,0-0,6)	0,133
IL-17⁺ in CD25⁺CD127⁻ FoxP3⁺	0,4 ± 0,1 (0,4; 0,3-0,5)	0,2 ± 0,2 (0,2; 0,0,-0,3)	0,133
IL-17⁺FoxP3⁺	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0-0,1)	0,0 ± 0,0 (0,0; 0,0-0,0)	0,267
IL-17⁺CCR6⁺	0,4 ± 0,2 (0,4; 0,1-0,6)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0-0,1)	0,133
RORγt⁺	0,8 ± 0,2 (0,8; 0,5-1,0)	0,9 ± 0,1 (0,9; 0,8-1,0)	0,533
RORγt⁺FoxP3⁺	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,1-0,2)	0,1 ± 0,0 (0,1; 0,1-0,1)	0,533

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

3.1.7 Charakterisierung der Tregs nach Stimulation

Innerhalb dieses Kapitels werden die Veränderungen der Tregs durch verschiedene Stimuli in Zellkultur verglichen. Zunächst werden hierfür die verschiedenen Stimulationen in gesunden Kontrollen und anschließend in Patienten mit Psoriasis einzeln verglichen. Anschließend erfolgt eine Analyse der Veränderungen zwischen Patienten und Kontrollen.

3.1.7.1 Kollektiv der PSO und HC bei Treg-Charakterisierung

Tabelle 26: Demografische Daten von PSO und HC der Treg-Charakterisierung.

	PSO	HC
Anzahl an Proben	4	5
Anzahl an Männern	3 (75%)	3 (60%)
/ Frauen (in %)	1 (25%)	2 (40%)
Alter am Tag des Studieneinschlusses (Jahre)	51,5 ± 4,2 (51; 47-57)	23,0 ± 1,1 (23,0; 22-25)
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	36,8 ± 5,4 (37; 29-44)	
Dauer der Erkrankung (Jahre)	14,8 ± 6,8 (18,5; 3-2)	

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum). PSO = Psoriasis, HC = Gesunde Kontrolle)

Tabelle 27: Klinische Daten von PSO und HC der Treg-Charakterisierung.

Apremilast (in therapeutischer Dosierung)	1 (25%)		
Biologika (in therapeutischer Dosierung)	3 (75%)	Adalimumab	1 (25%)
		Ustekinumab	1 (25%)
		Secukinumab	1 (25%)
PASI (Psoriasis Area and Severity Index)	2,9 ± 2.4 2,7; (0,5-5,8)		

CRP (C-reaktives Protein) (mg/dl)	0,1 ± 0,1 0,1; (0,0-0,3)
Leukozyten x10³ /µl (Normwert 4.8-10)	9,0 ± 1,5 8,8; (7,4-11,1)
Lymphozyten x10³ /µl (Normwert 1-4.05)	2,1 ± 0,7 1,7; (1,5-3,3)
Lymphozyten in %	22,3 ± 4.4 20,5; (18-30)
Thrombozyten x10³ /µl (Normwert 150-450)	274,5 ± 43,7 289; (203-317)

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum).

3.1.7.2 CCR6 und FoxP3 Expression nach Stimulation bei HC

Innerhalb der HC zeigte sich in der Expression von CCR6 kein Unterschied durch verschiedene Stimulationen in CD4⁺-Zellen. In der Population der CD4⁺FoxP3⁺-Zellen zeigte sich im Vergleich zu anderen Stimulationen eine nicht signifikante Reduktion von CCR6 nach Stimulation im Th17-Milieu.

Die FoxP3-Expression in CD4⁺-Zellen und CD4⁺CD25⁺CD127⁻-Zellen war ohne Stimulation am geringsten. Im Vergleich zu den anderen Stimulationen ist die Expression von FoxP3 vor allem in anti-IL-17 und Th17 erhöht. Ein signifikanter Unterschied kann nicht gezeigt werden (Vgl. Abbildung 24). Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 51 dargestellt, die Abbildung als verbundene Darstellung in Abbildung 25.

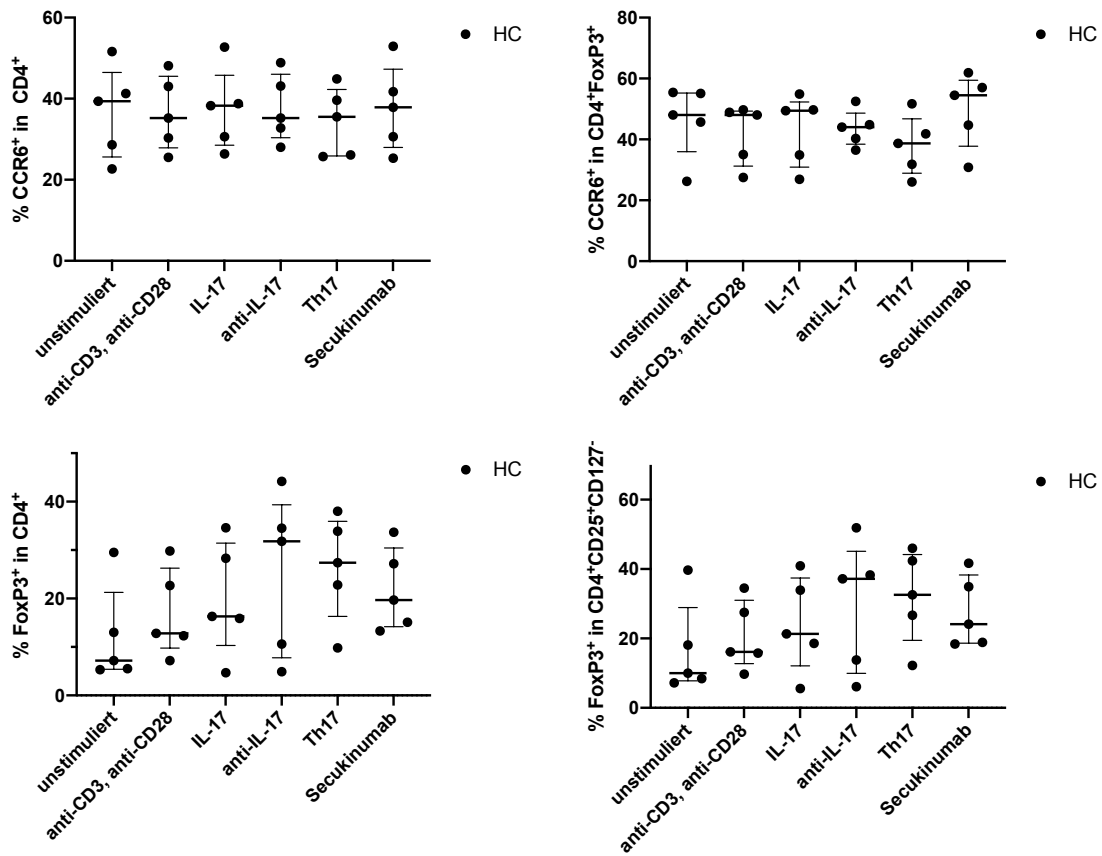


Abbildung 24: CCR6⁺ und FoxP3⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC.

Prozentualer Anteil von FoxP3-Expression innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und der Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in HC mit Median und Interquartilabstand. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

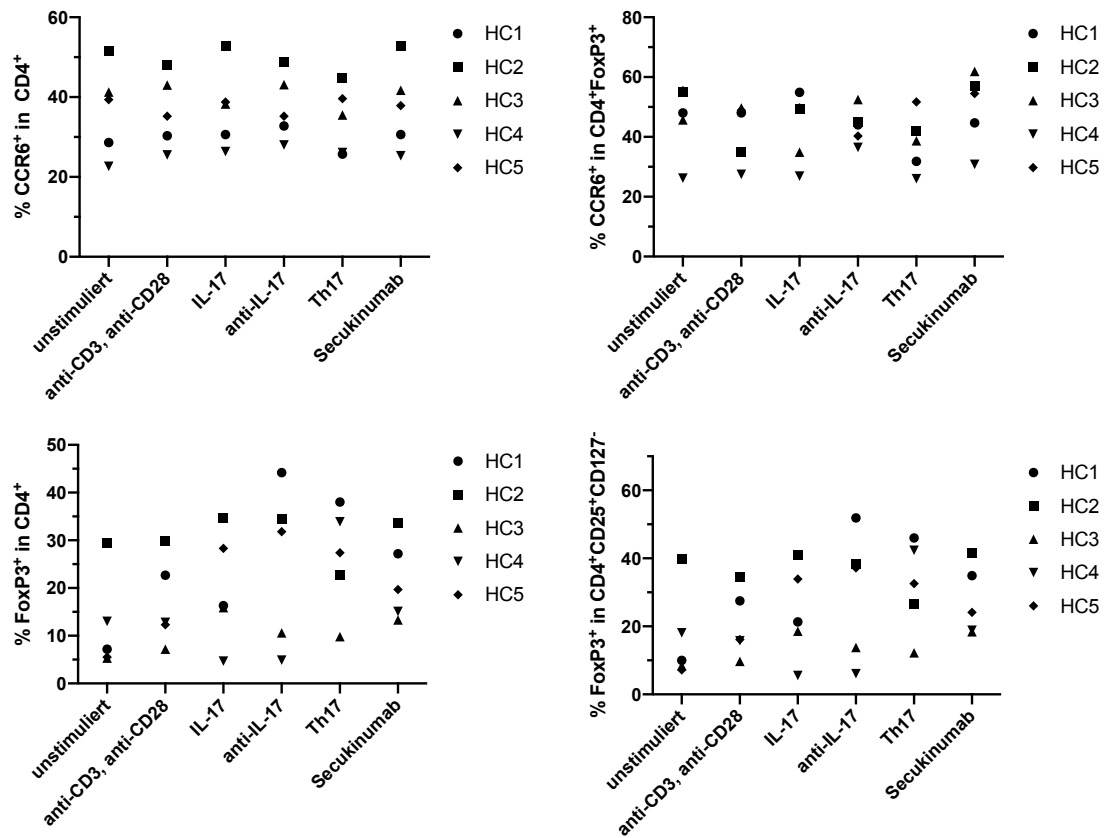


Abbildung 25: CCR6⁺ und FoxP3⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC als verbundene Darstellung.

Prozentualer Anteil von FoxP3-Expression innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und der Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in HC. Die unterschiedlichen HC werden hierbei mit unterschiedlichen Symbolen dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.1.7.3 IL-17 Expression nach Stimulation bei HC

Innerhalb der Expression von IL-17 in verschiedenen Subpopulationen konnte insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen verschiedenen Stimulationen nachgewiesen werden. Tendenziell zeigte sich innerhalb des Th17-Milieus eine erhöhte Expression innerhalb der CD4⁺-, CD4⁺FoxP3⁺- und CD4⁺CCR6⁺FoxP3⁺-Zellen. Eher geringere Expressionen von IL-17 zeigten sich bei Stimulation mit Secukinumab, antiCD3/CD28 und unstimulierten Zellen (Vgl. Abbildung 26 und Abbildung 27). Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 51 dargestellt.

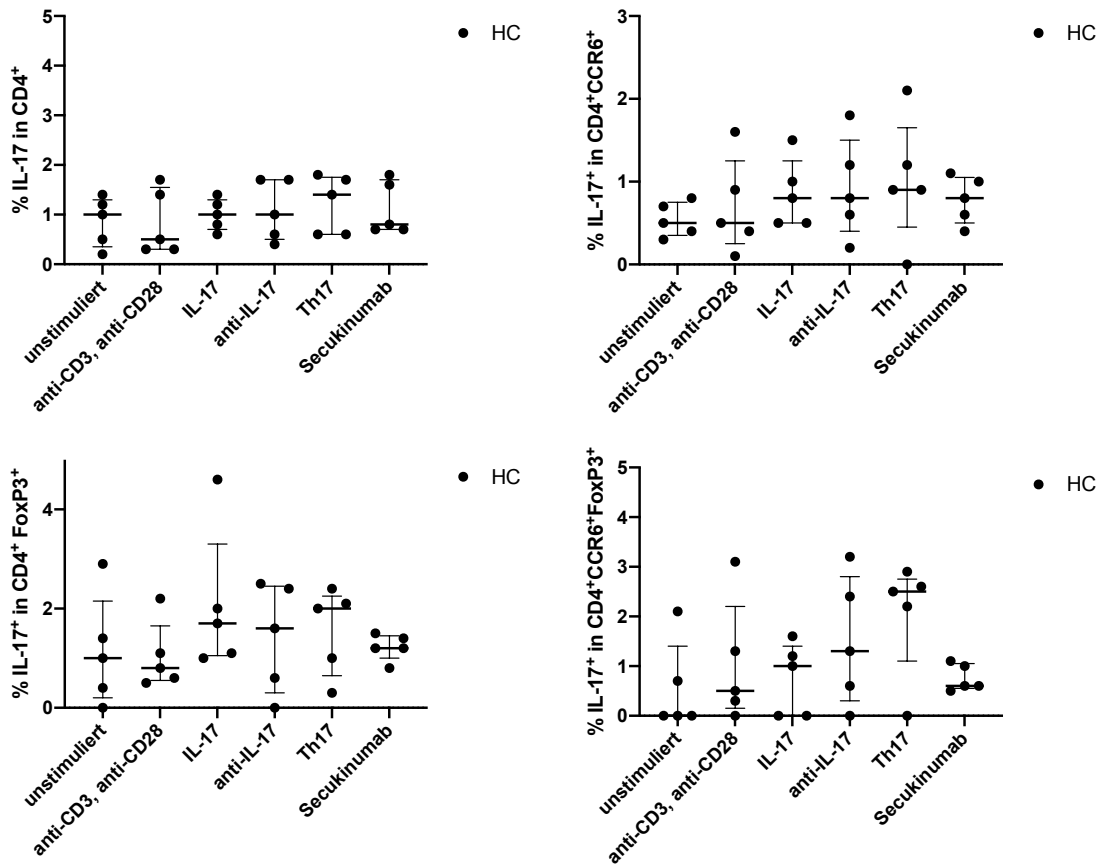


Abbildung 26: IL-17⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC.

Prozentualer Anteil IL-17 Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in HC mit Median und Interquartilabstand. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

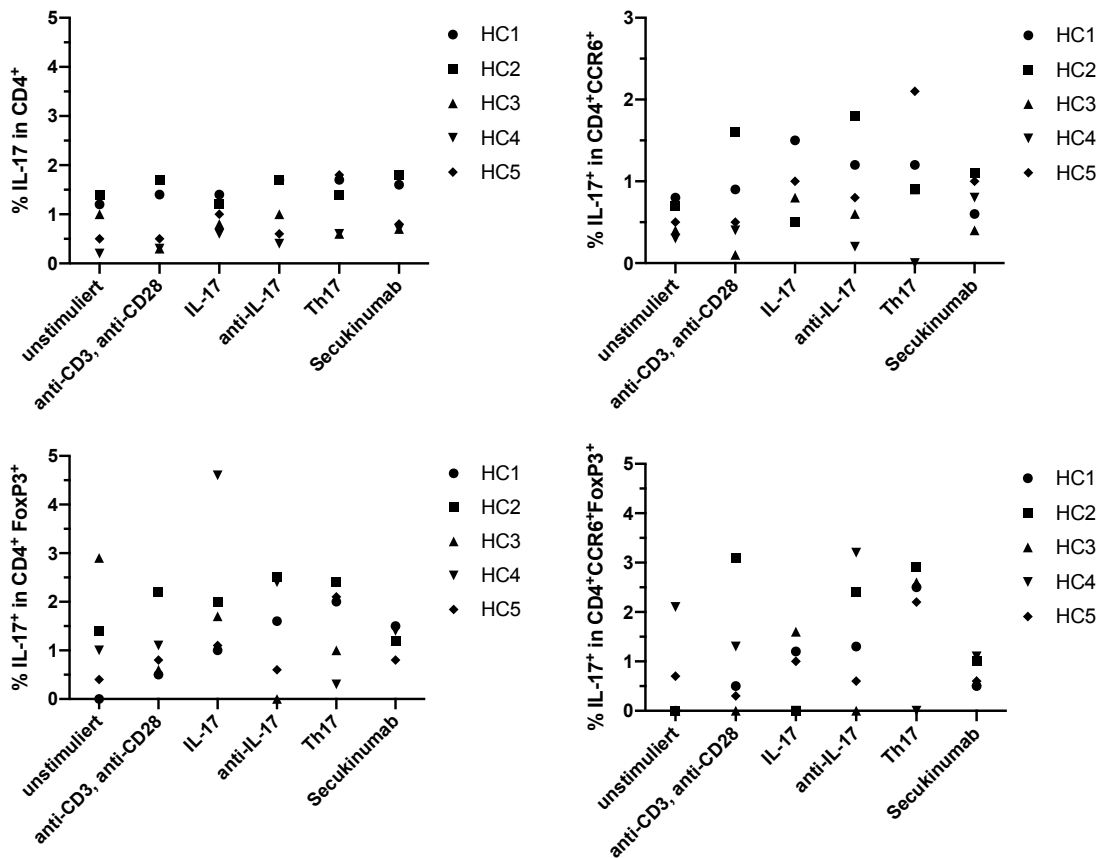


Abbildung 27: IL-17⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC als verbundene Darstellung.

Prozentualer Anteil IL-17 Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in HC. Die unterschiedlichen HC werden hierbei mit unterschiedlichen Symbolen dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.1.7.4 IFN γ Expression nach Stimulation bei HC

In der Gruppe der IFN γ ⁺-Zellen konnte innerhalb der CD4⁺-, CD4⁺CCR6⁺-, CD4⁺FoxP3⁺- und CD4⁺CCR6⁺FoxP3⁺-Zellen kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden (Vgl. Abbildung 28 und Abbildung 29). Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 51 dargestellt.

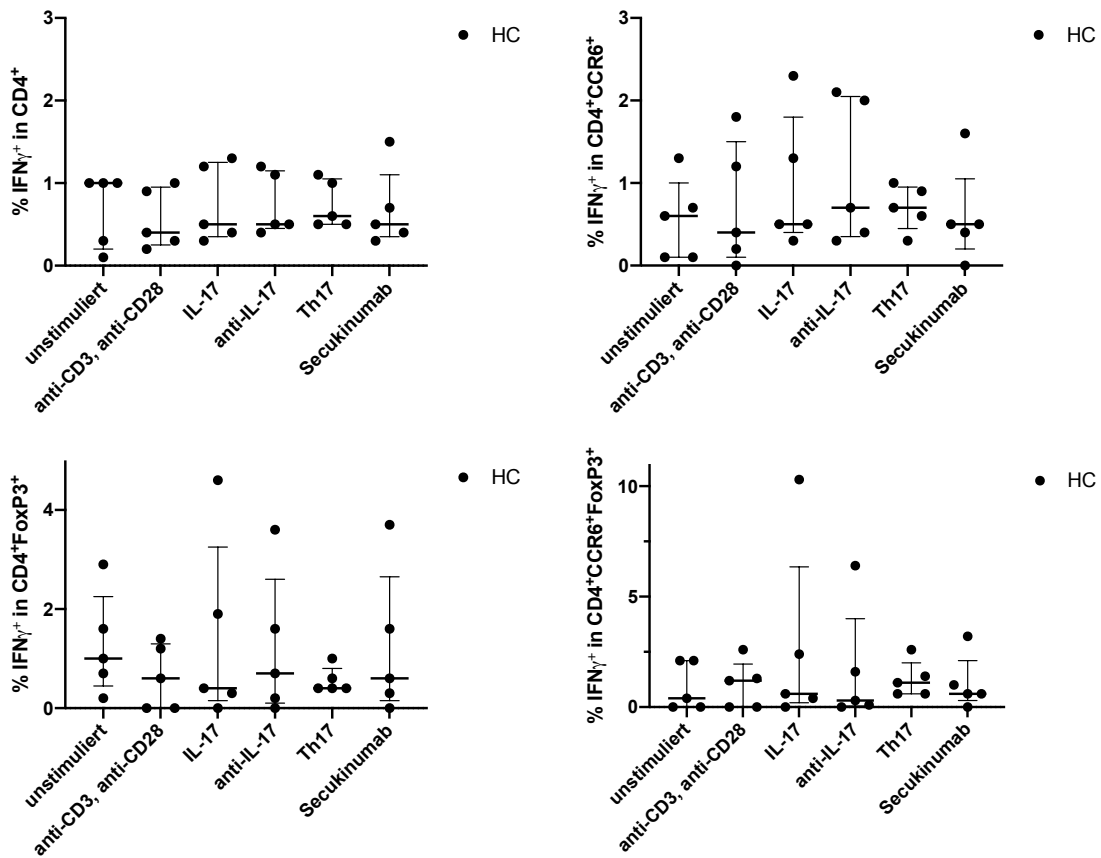
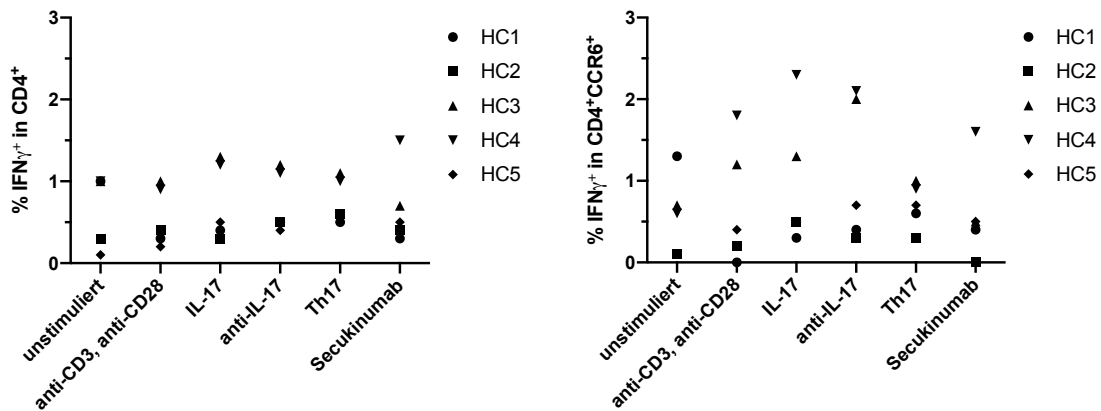


Abbildung 28: IFN γ ⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC.

Prozentualer Anteil IFN γ Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in HC mit Median und Interquartilabstand. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.



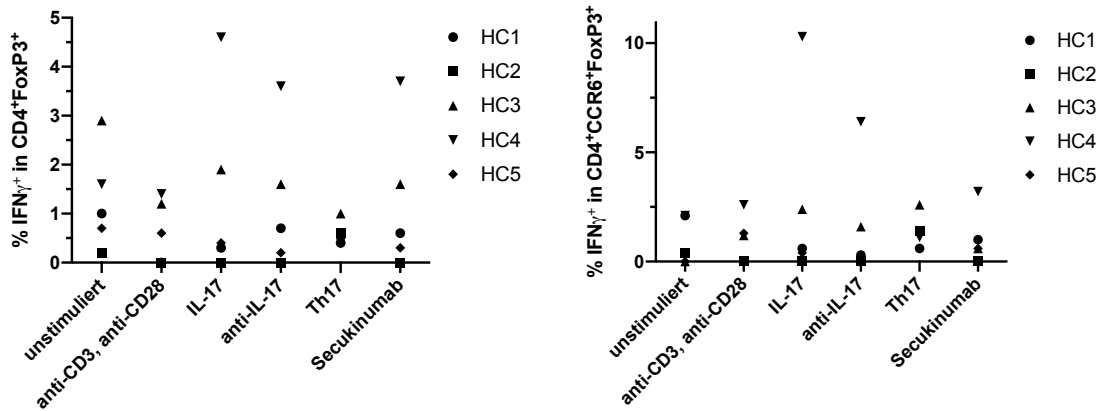


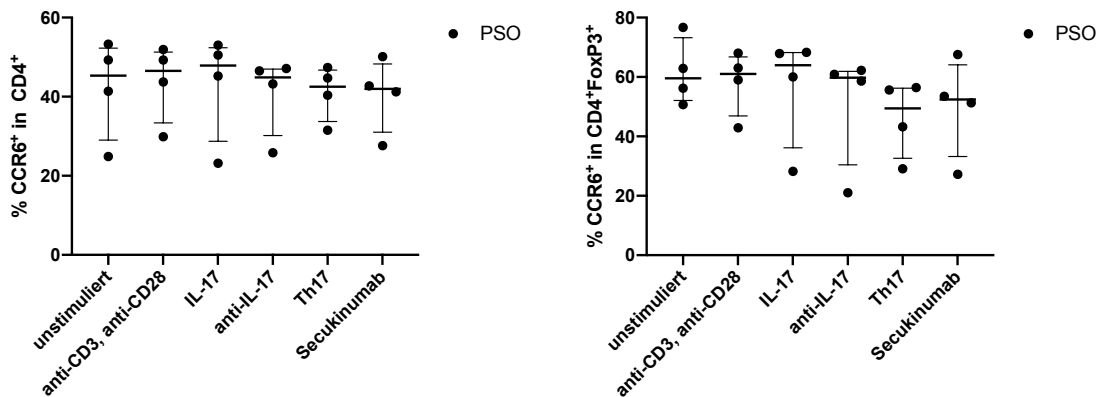
Abbildung 29: IFN γ ⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC als verbundene Darstellung.

Prozentualer Anteil IFN γ Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in HC. Die unterschiedlichen HC werden hierbei mit unterschiedlichen Symbolen dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.1.7.5 CCR6 und FoxP3 Expression nach Stimulation bei PSO

In der Expression von CCR6 konnte auch innerhalb der Kohorte von PSO kein signifikanter Unterschied zwischen verschiedenen Stimulationen gezeigt werden. Innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺-Zellen zeigten sich tendenziell niedrigste Mittelwerte unter Stimulation mit Th17-Milieu und Secukinumab.

In der FoxP3-Expression konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied dargestellt werden. In der Gruppe der unstimulierten Zellen fanden sich die niedrigsten Werte für FoxP3, die höchsten bei IL-17 und Th17 (Vgl. Abbildung 30 und Abbildung 31). Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 51 dargestellt.



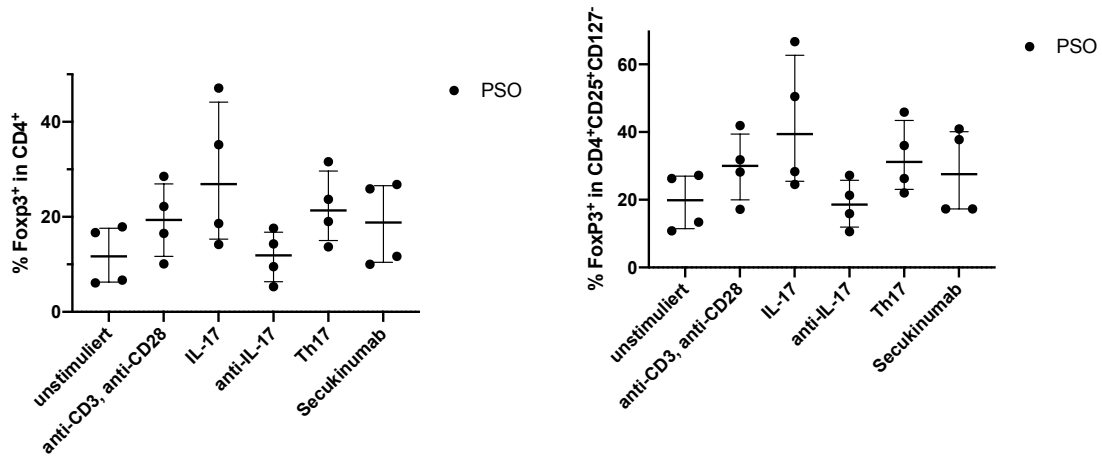


Abbildung 30: CCR6⁺ und FoxP3⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO

Prozentualer Anteil an CCR6- und FoxP3-Expression innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und der Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in PSO mit Median und Interquartilabstand. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

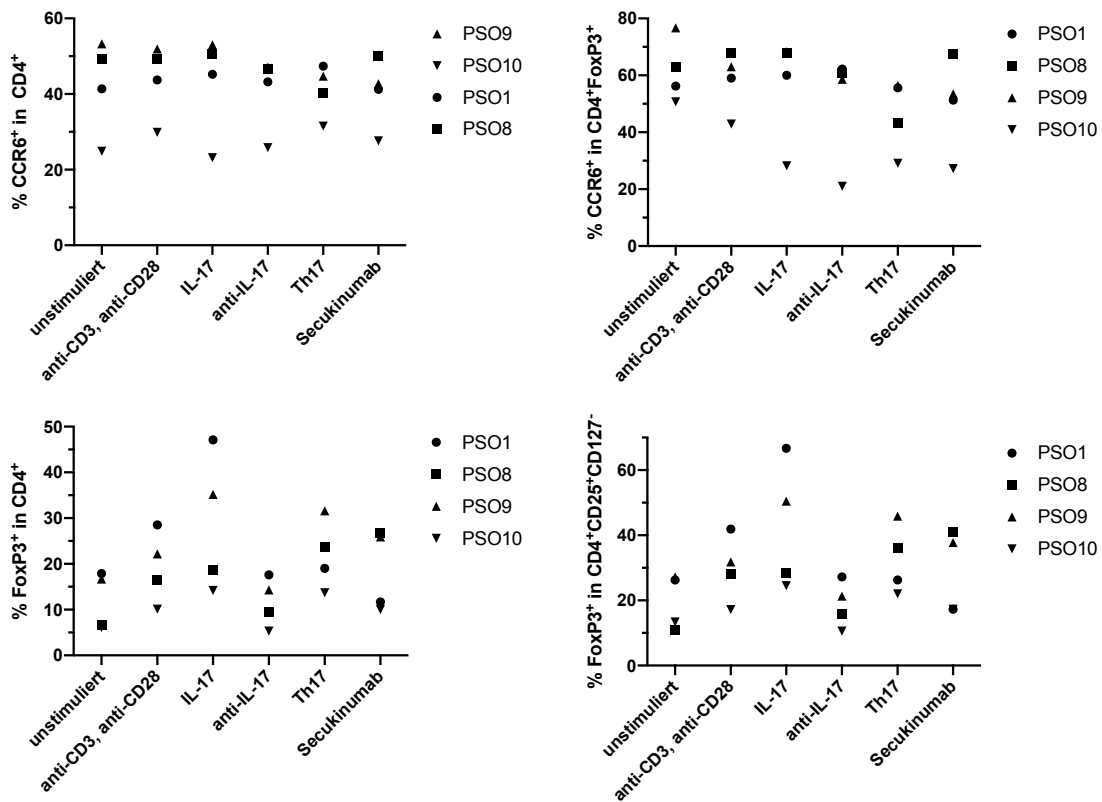


Abbildung 31: CCR6⁺ und FoxP3⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO als verbundene Darstellung.

Prozentualer Anteil an CCR6- und FoxP3-Expression innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und der Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in PSO. Die unterschiedlichen PSO werden hierbei mit unterschiedlichen Symbolen dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.1.7.6 IL-17 Expression nach Stimulation bei PSO

Analog zur Kontrollgruppe konnte bei der Gruppe von Patienten mit Psoriasis kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von IL-17 bei verschiedenen Stimulationen gezeigt werden. In CD4⁺- und CD4⁺CCR6⁺-Zellen waren die niedrigsten Werte unter unstimulierten Zellen und unter Stimulation mit antiCD3/CD28 zu finden (Vgl. Abbildung 32 und Abbildung 33). Die zugehörigen Dot Plots sind in Abbildung 51 dargestellt.

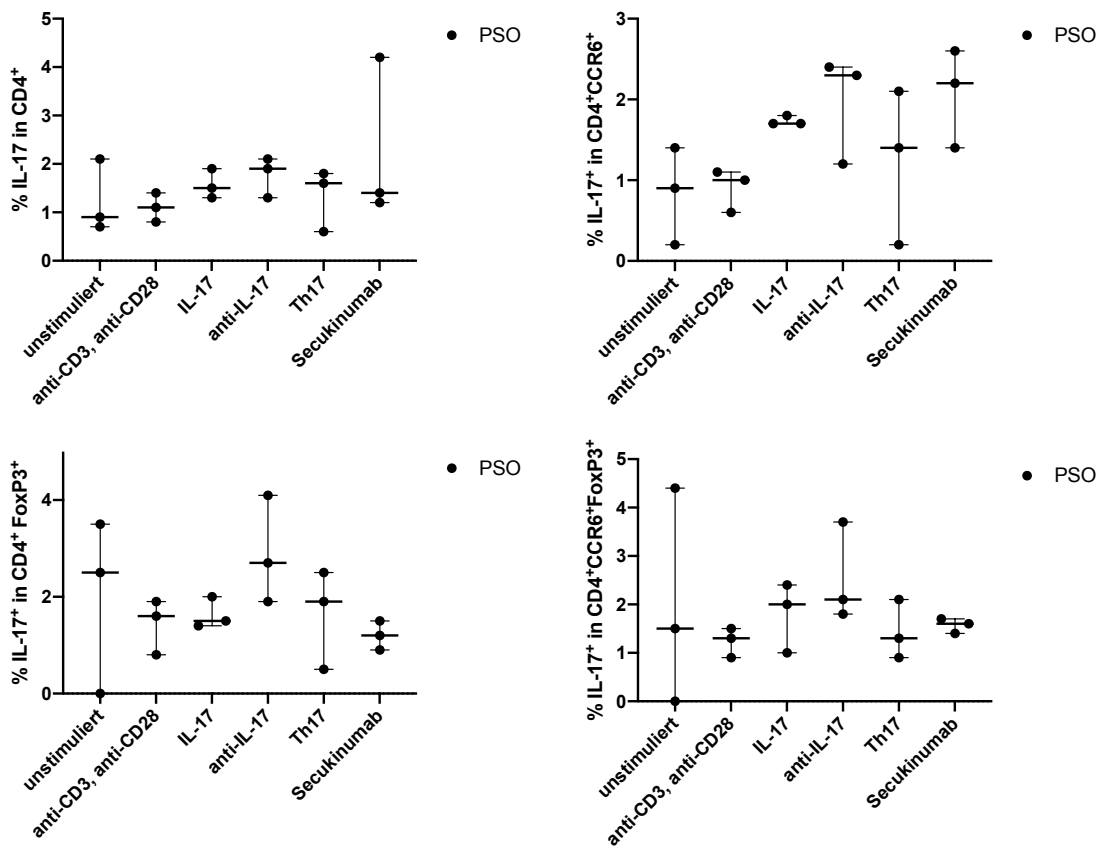


Abbildung 32: IL-17⁺ in Tregs nach Stimulation bei Patienten mit Psoriasis.

Prozentualer Anteil IL-17 Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in PSO mit Median und Interquartilabstand. Die unterschiedlichen PSO werden hierbei mit unterschiedlichen Symbolen dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

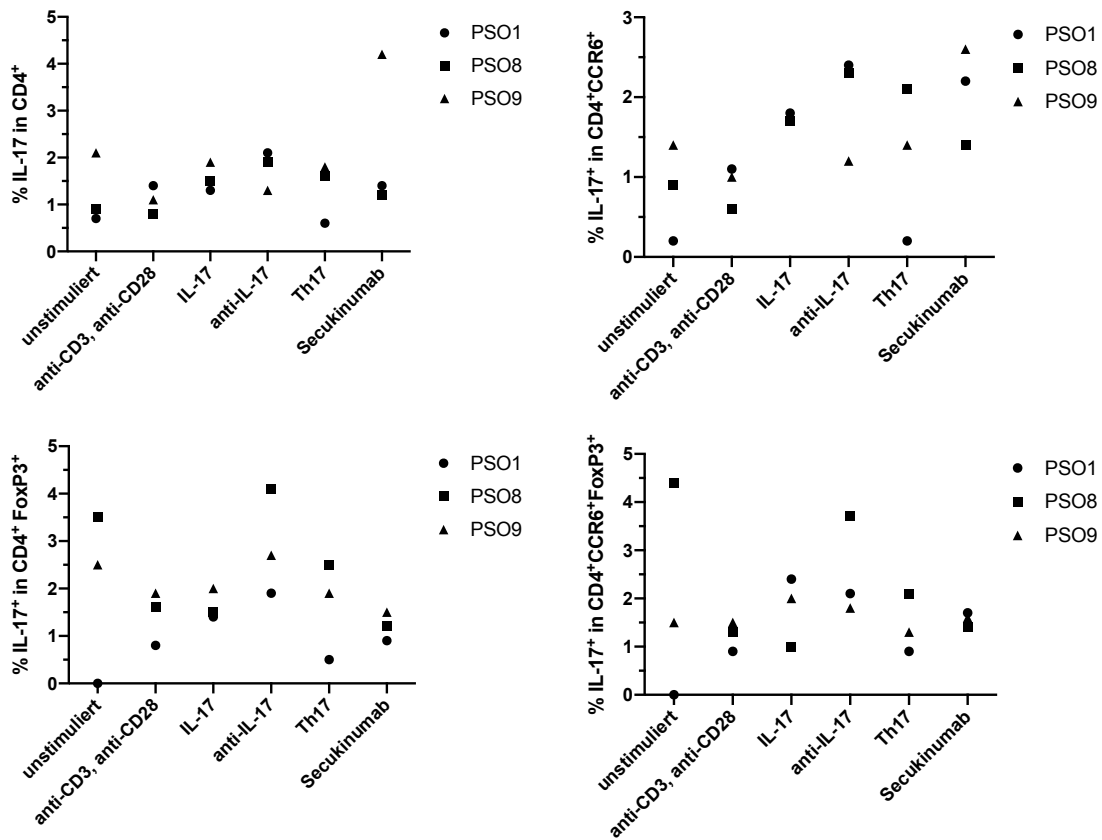


Abbildung 33: IL-17⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO als verbundene Darstellung.

Prozentualer Anteil IL-17 Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in PSO. Die unterschiedlichen PSO werden hierbei mit unterschiedlichen Symbolen dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.1.7.7 IFN γ Expression nach Stimulation bei PSO

In der Zellpopulation der IFN γ ⁺-Zellen zeigte sich innerhalb der unstimulierten Zellen die niedrigste Expression innerhalb der Subpopulationen. Ein signifikanter Unterschied konnte innerhalb CD4⁺CRR6⁺FoxP3⁺-Zellen nachgewiesen werden. Dort zeigte sich durch Stimulation mit IL-17 eine signifikante Erhöhung von IFN γ im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Weitere signifikante Unterschiede fanden sich nicht (Vgl. Abbildung 34 und Abbildung 35). Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 51 dargestellt.

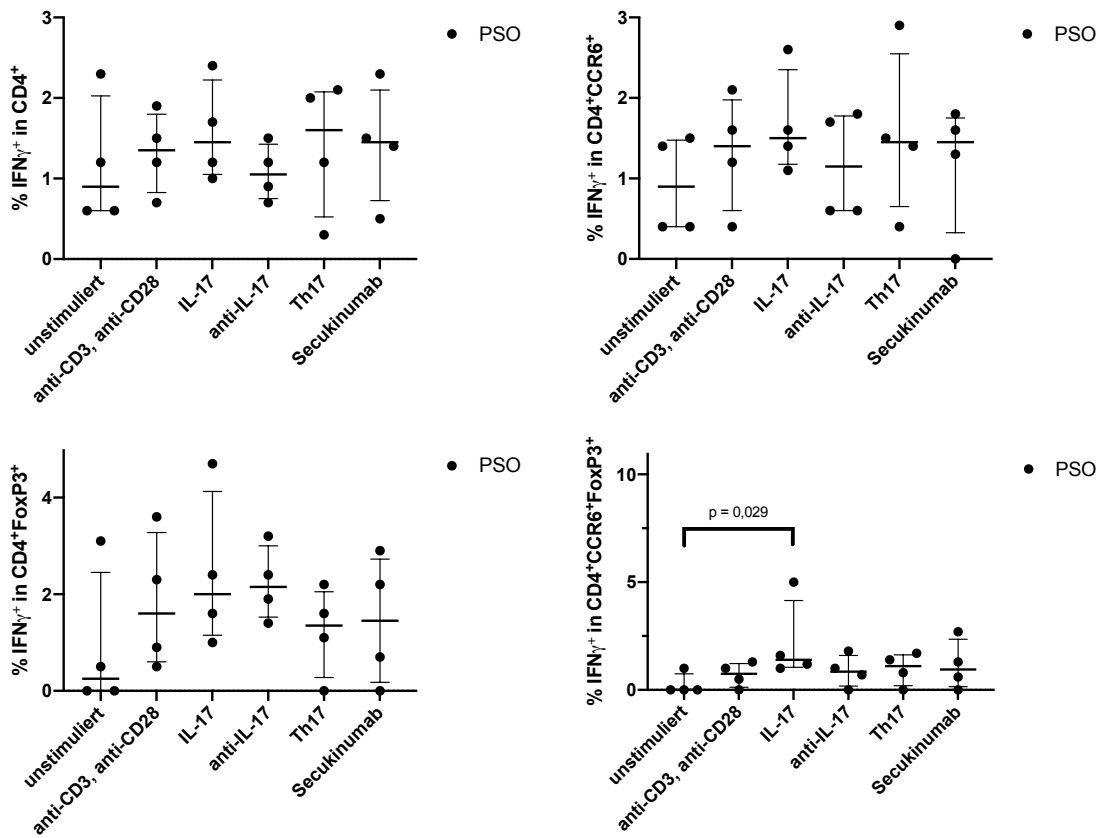
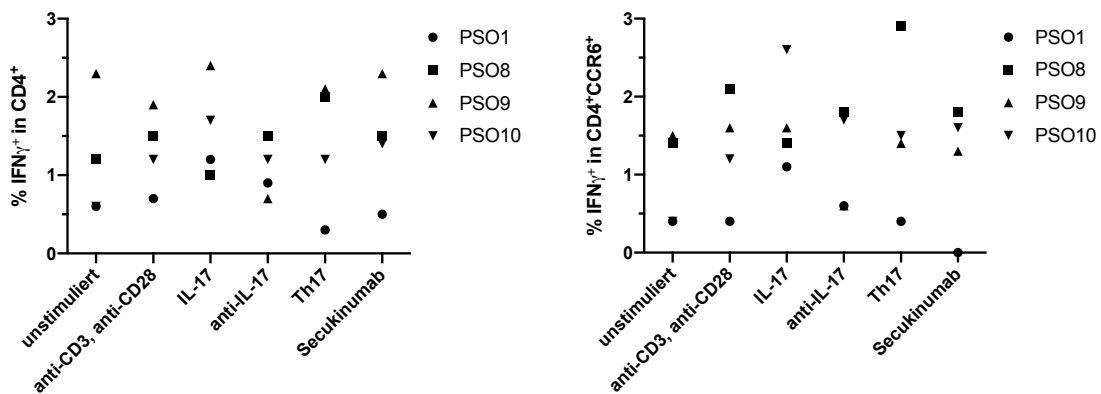


Abbildung 34: IFN γ ⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO.

Prozentualer Anteil an IFN γ -Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in PSO mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte (p<0,05) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.



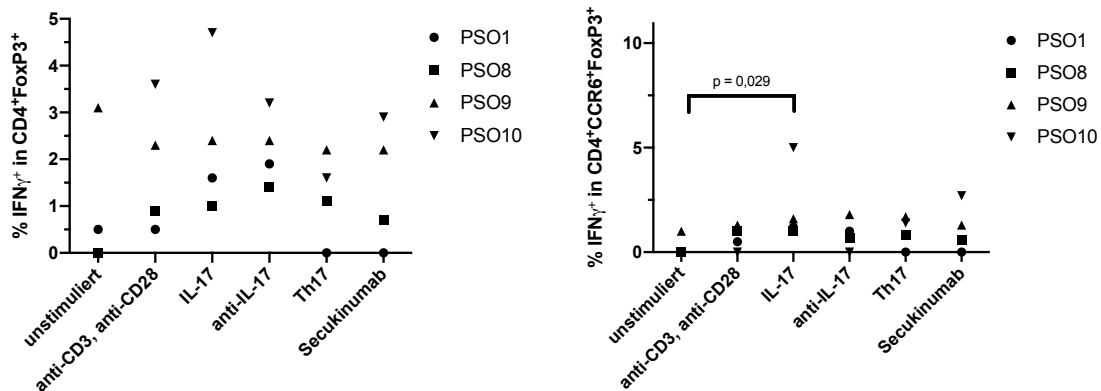


Abbildung 35: IFN γ ⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO als verbundene Darstellung.

Prozentualer Anteil an IFN γ -Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in PSO. Die unterschiedlichen PSO werden hierbei mit unterschiedlichen Symbolen dargestellt. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.1.7.8 Vergleich der Treg-Charakterisierung zwischen HC und PSO

Nach dem Vergleich der Einflüsse verschiedener Stimulationen der einzelnen Studienpopulationen separat erfolgte der Vergleich der Stimulationen zwischen HC und PSO.

In der Expression von CCR6 fand sich kein signifikanter Unterschied. Auch wenn sich in der Tendenz in CD4⁺-Zellen nach der Zellkultur unter allen Stimuli eine erhöhte Expression von CCR6 bei PSO zeigte. Dies spiegelte sich auch in den Subgruppen wider, wobei unter Stimulation mit Secukinumab keine erhöhte Anzahl an CCR6⁺-Zellen in CD4⁺FoxP3⁺- sowie CD4⁺CD25⁺⁺CD127⁻FoxP3⁺-Zellen nachgewiesen werden konnte (Vgl. Abbildung 36, Tabelle 28).

Im Anteil der FoxP3⁺-Zellen konnte sowohl in CD4⁺-Zellen, als auch in CD4⁺CD25⁺CD127⁻-Zellen kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Unter Stimulation mit Th17, anti-IL-17 und Secukinumab konnten jedoch im Mittelwert niedrigere FoxP3-Expressionen bei PSO im Vergleich HC gezeigt werden. Unter unstimulierten Zellen und Stimulation mittels antiCD3/CD28, sowie IL-17 zeigte sich im Mittelwert eher eine erniedrigte Anzahl an FoxP3⁺-Zellen in

HC (Vgl. Abbildung 36, Tabelle 29). Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 51 dargestellt.

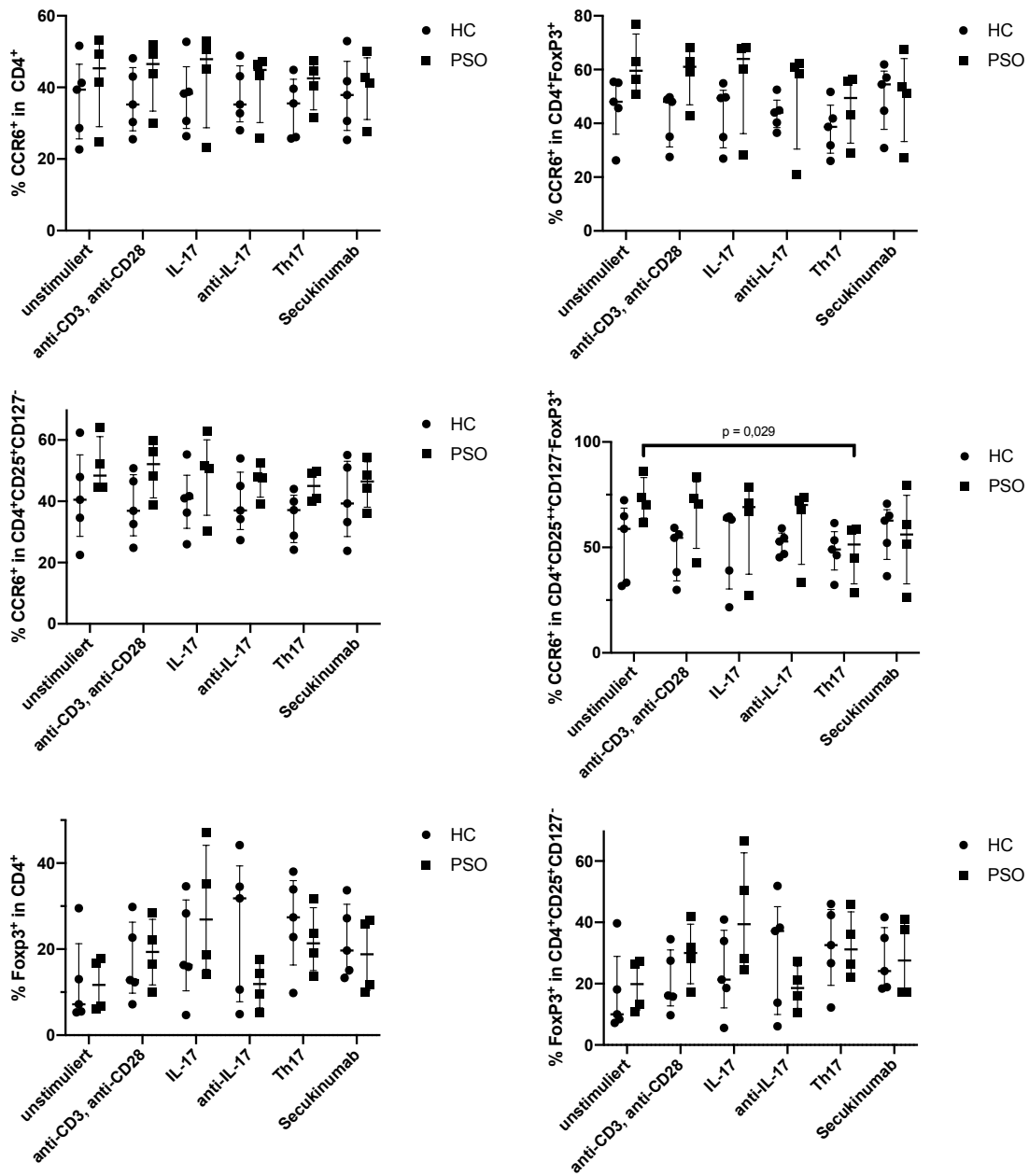
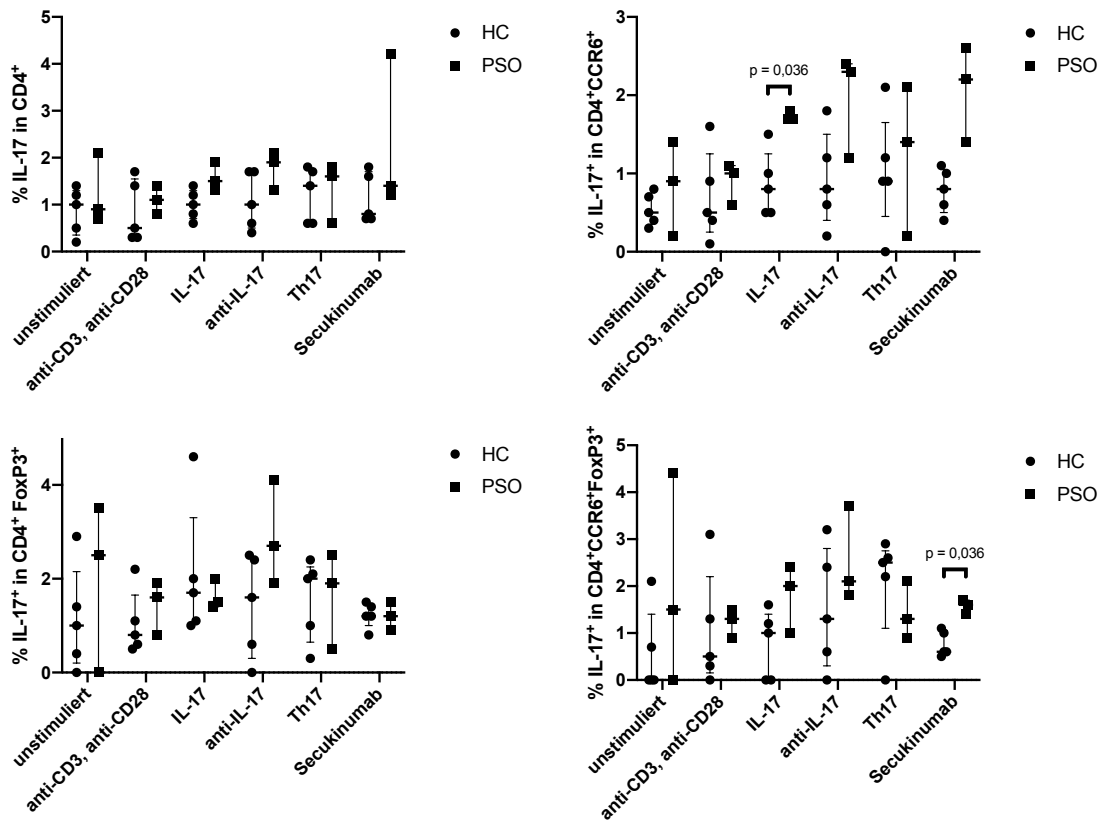


Abbildung 36: CCR6+ und FoxP3⁺-Zellen in CD4⁺-Zellen und Subpopulationen.

Prozentualer Anteil an CCR6⁺ und FoxP3⁺ innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in PSO und HC mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Im Vergleich der HC und PSO ergab sich für die PSO in der Expression von IL-17 ein signifikanter Unterschied unter Stimulation mit IL-17 in der Subpopulation der CD4⁺CCR6⁺-Zellen. Des Weiteren konnte eine signifikante Erhöhung von IL-17 in CD4⁺CCR6⁺FoxP3⁺-Zellen nach Stimulation mit Secukinumab in PSO im Vergleich zur HC nachgewiesen werden. Tendenziell zeigten sich jedoch (ähnlich zur Expression von CCR6) vermehrt IL-17⁺-Zellen bei PSO nach der Zellkultur unter allen Stimulationen. Nur in der Subpopulation der CD4⁺CD25⁺⁺CD127⁻FoxP3⁺-Zellen ist dieser Unterschied nicht zu finden, oder IL-17⁺-Zellen tendenziell geringer in PSO (Vgl. Abbildung 37 Tabelle 29). Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 51 dargestellt.



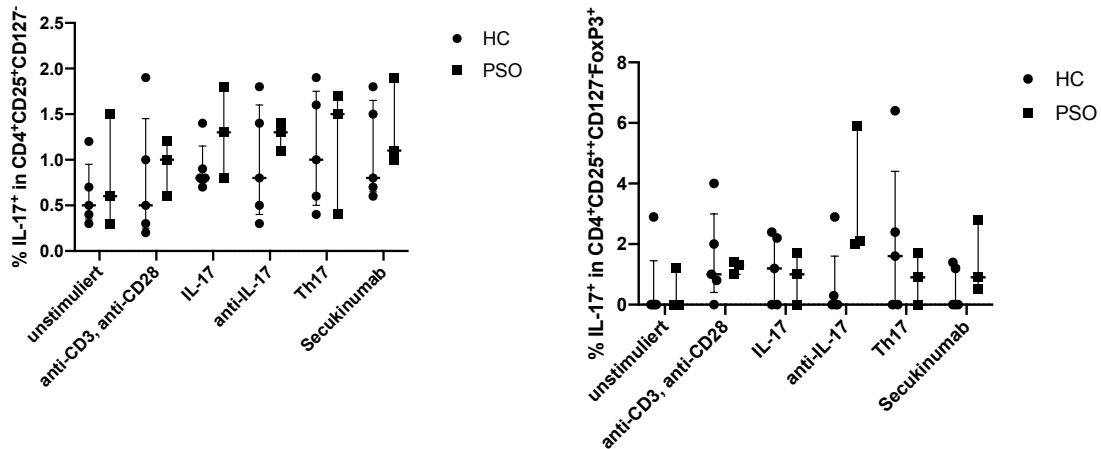


Abbildung 37: IL-17⁺-Zellen in CD4⁺-Zellen und Subpopulationen.

Prozentualer Anteil an IL-17 Produktion innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in PSO und HC mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Im Verhältnis von IFN γ ⁺-Zellen und IFN γ ⁺IL-17⁺-Zellen bei HC zu PSO konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. In der Tendenz zeigte sich jedoch (ähnlich zu den Ergebnissen von CCR6 und IL-17) eine erhöhte Expression von IFN γ in CD4⁺- und CD4⁺CCR6⁺-Zellen unter jeglicher Stimulation und bei unstimulierten Zellen nach der Zellkultur. Nur innerhalb der CD4⁺FoxP3⁺-Zellen konnte unter der Stimulation mit IL-17 und Secukinumab kein Unterschied zwischen PSO und HC gezeigt werden (Vgl. Abbildung 37, Tabelle 30).

Bei Koexpression von IFN γ und IL-17 konnte eine signifikante Erhöhung bei PSO nach Stimulation mit IL-17 in der Subpopulation der CD4⁺CCR6⁺-Zellen gezeigt werden. Es zeigte sich auch hier in der Gesamtheit eine Erhöhung in allen Stimulationen und Subpopulationen bei PSO nach der Zellkultur (Vgl. Abbildung 37, Tabelle 30). Die zugehörigen Dot Blots sind in Abbildung 51 dargestellt.

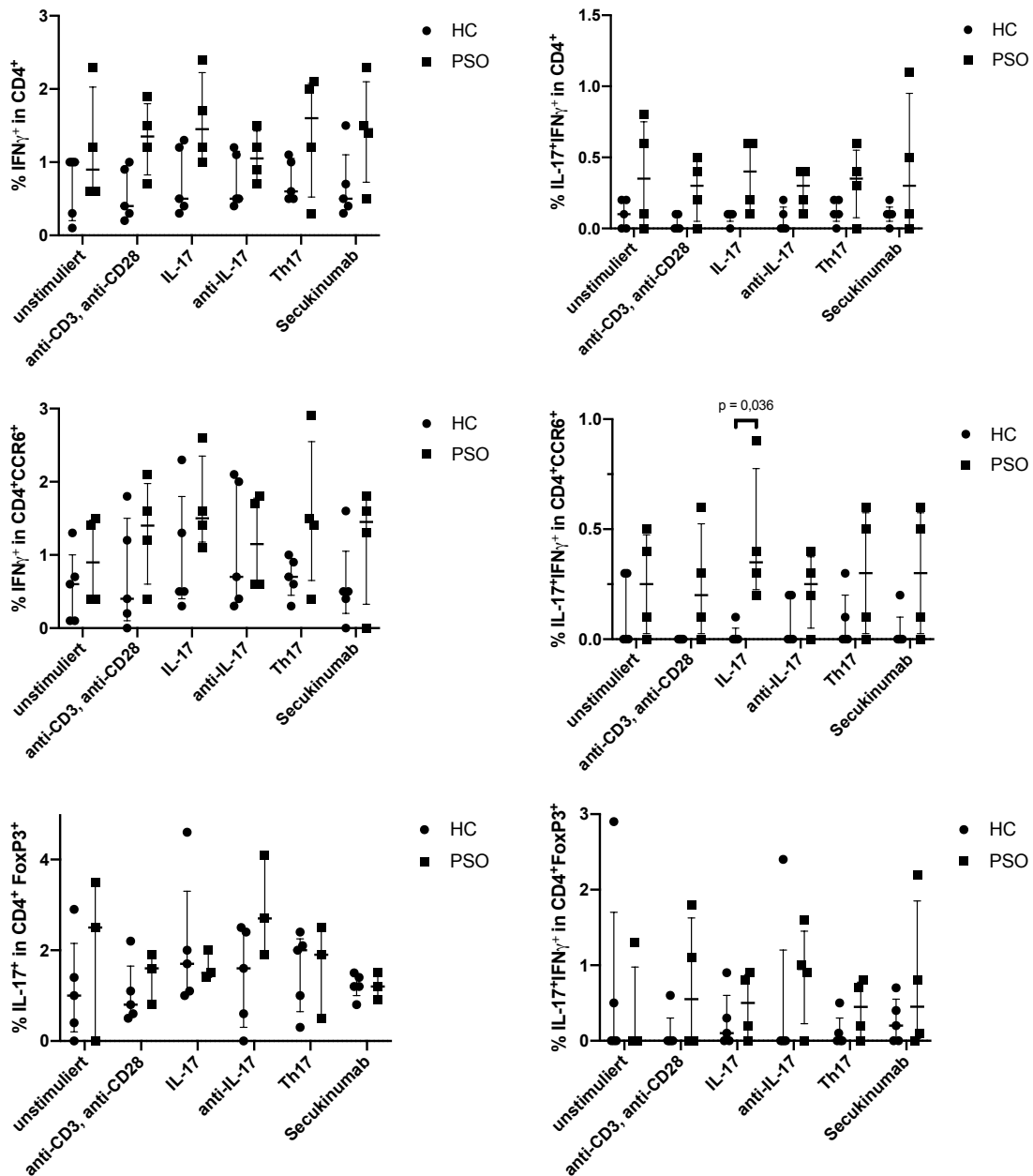


Abbildung 38: IFN γ ⁺- und IL-17⁺IFN γ ⁺- Zellen in CD4⁺-Zellen und Subpopulationen.

Prozentualer Anteil an IFN γ -Produktion und IL-17 innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationen in PSO und HC mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Tabelle 28: Prozentuale Verteilung CCR6⁺ Zellen in CD4⁺ Zellen und Subpopulationen

	CCR6 ⁺ % in CD4 ⁺			CCR6 ⁺ % in CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻			CCR6 ⁺ % in CD4 ⁺ FoxP3 ⁺		
	PSO	HC	p-Wert	PSO	HC	p-Wert	PSO	HC	p-Wert
unstimuliert	42,2 ± 12,6 (45,3; 24,9-53,3)	36,7 ± 11,3 (39,4; 22,7-51,6)	0,032	51,4 ± 9,2 (48,4; 44,5-64,1)	41,6 ± 14,9 (40,5; 22,5-62,4)	0,286	61,6 ± 11,2 (59,6; 50,7-76,7)	46,1 ± 11,9 (48,0; 26,2-55,4)	0,063
anti-CD3, anti-CD28	43,7 ± 9,8 (46,5; 29,9-51,9)	41,8 ± 10,0 (48,0; 27,5-49,7)	0,111	50,7 ± 9,3 (52,1; 38,7-59,7)	38,3 ± 10,5 (36,9; 24,8-50,8)	0,111	58,2 ± 10,9 (61,0; 42,9-68,0)	41,8 ± 10,0 (48,0; 27,5-49,7)	0,111
IL-17	43,0 ± 13,6 (47,9; 23,2-53,0)	43,2 ± 11,7 (49,4; 26,9-54,9)	0,190	48,9 ± 13,5 (51,3; 30,3-62,8)	40,1 ± 10,6 (41,0; 26-55,3)	0,413	56,1 ± 19,0 (64,0; 28,2-68,3)	43,2 ± 11,7 (49,4; 26,9-54,9)	0,190
anti-IL-17	40,7 ± 10,0 (44,9; 25,8-47,1)	43,6 ± 6,0 (44,0; 36,5-52,5)	0,286	46,8 ± 5,5 (47,9; 39,2-52,4)	39,5 ± 10,3 (37,0; 27,3-54,0)	0,286	50,7 ± 19,8 (60,0; 21,0-62,2)	43,6 ± 6,0 (44,0; 36,5-52,5)	0,286
Th17	41,0 ± 7,0 (42,6; 31,5-47,4)	38,0 ± 9,8 (38,7; 26,0-51,7)	0,286	45,0 ± 5,2 (45,0; 39,9-49,9)	34,8 ± 8,1 (37,1; 24,2-44,0)	0,063	46,1 ± 12,8 (49,4; 29,1-56,4)	38,0 ± 9,8 (38,7; 26,0-51,7)	0,286
Secukinumab	40,4 ± 9,4 (42,0; 27,6-50,1)	50,0 ± 12,3 (54,5; 30,8-61,9)	0,905	45,8 ± 7,7 (46,5; 36,0-54,3)	40,5 ± 12,8 (39,3; 23,8-55,1)	0,730	49,9 ± 16,8 (52,4; 27,2-67,6)	49,8 ± 12,3 (54,5; 30,8-61,9)	0,905

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Tabelle 29: Prozentuale Verteilung von IL17⁺ Zellen und FoxP3⁺-Zellen in CD4⁺ Zellen und Subpopulationen

	IL-17 ⁺ (%) in CD4 ⁺			IL-17 ⁺ (%) in CD4 ⁺ FoxP3 ⁺			IL-17 ⁺ (%) in CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻		
	PSO	HC	p-Wert	PSO	HC	p-Wert	PSO	HC	p-Wert
unstimuliert	1,2 ± 0,8 (0,9; 0,7-2,1)	0,9 ± 0,5 (1,0; 0,2-1,0)	0,786	2,0 ± 1,8 (2,5; 0,0-3,5)	1,1 ± 1,1 (1,0; ,0,0-2,9)	0,571	0,8 ± 0,6 (0,6; 0,3-1,5)	0,6 ± 0,4 (0,5; 0,3-1,2)	0,786
anti-CD3, anti-CD28	1,1 ± 0,3 (1,1; 0,8-1,4)	0,8 ± 0,7 (0,5; 0,3-1,7)	0,571	1,4 ± 0,6 (1,6; 0,8-1,9)	1,0 ± 0,7 (0,8; 0,5-2,2)	0,393	0,9 ± 0,3 (1,0; 0,6-1,2)	0,8 ± 0,7 (0,5; 0,2-1,9)	0,393
IL-17	1,6 ± 0,3 (1,5; 1,3-1,9)	1,0 ± 0,3 (1,0; 0,6-1,4)	0,071	1,6 ± 0,3 (1,5; 1,4-2,0)	2,1 ± 1,5 (1,7; 1,0-4,6)	1,000	1,3 ± 0,5 (1,3; 0,8-1,8)	0,9 ± 0,3 (0,8; 0,7-1,4)	0,393
anti-IL-17	1,8 ± 0,4 (1,9; 1,3-2,1)	1,1 ± 0,6 (1,0; 0,4-1,7)	0,143	2,9 ± 1,1 (2,7; 1,9-4,1)	1,4 ± 1,1 (1,6; 0,0-2,5)	0,143	1,3 ± 0,2 (1,3; 1,1-1,4)	1,0 ± 0,6 (0,8; 0,3-1,8)	0,571
Th17	1,3 ± 0,6 (1,6; 0,6-1,8)	1,2 ± 0,6 (1,4; 0,6-1,8)	0,786	1,6 ± 1,0 (1,9; 0,5-2,6)	1,6 ± 0,9 (2,0; 0,3-2,4)	1,000	1,2 ± 0,7 (1,5; 0,4-1,7)	1,1 ± 0,6 (1,0; 0,4-1,9)	1,000
Secukinumab	0,3 ± 1,7 (1,4; 1,2-4,2)	1,1 ± 0,5 (0,8; 0,7-1,8)	0,393	1,2 ± 0,3 (1,2; 0,9-1,5)	1,2 ± 0,3 (1,2; 0,8-1,5)	1,000	1,3 ± 0,5 (1,1; 1,0-1,9)	1,1 ± 0,5 (0,8; 0,6-1,8)	0,393
	IL-17 ⁺ (%) in CD4 ⁺ CCR6 ⁺ FoxP3 ⁺			IL-17 ⁺ (%) in CD4 ⁺ CCR6 ⁺			FoxP3 ⁺ in CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻		
	PSO	HC	p-Wert	PSO	HC	p-Wert			
unstimuliert	2,0 ± 2,2 (1,5; 0,0-4,4)	0,6 ± 0,9 (0,0; 0,0-2,1)	0,393	0,8 ± 0,6 (0,9; 0,2-1,4)	0,5 ± 0,2 (0,5; 0,3-0,8)	0,571	19,4 ± 8,5 (19,9; 10,8-27,2)	16,7 ± 13,6 (10,0; 7,2-39,7)	0,413
anti-CD3, anti-CD28	1,2 ± 0,3 (1,3; 0,9-1,5)	1,0 ± 1,2 (0,5; 0,0-3,1)	0,393	0,9 ± 0,3 (1,0; 0,6-1,1)	0,7 ± 0,6 (0,5; 0,1-1,6)	0,393	29,8 ± 10,2 (30,0; 17,2-41,9)	20,7 ± 10,0 (16,1; 9,7-34,5)	0,190
IL-17	1,8 ± 0,7 (2,0; 1,0-2,4)	0,8 ± 0,7 (1,0; 0,0-1,6)	0,143	1,7 ± 0,1 (1,7; 1,7-1,8)	0,9 ± 0,4 (0,8; 0,5-1,5)	0,036	42,5 ± 19,8 (39,4; 24,5-66,7)	24,1 ± 13,8 (21,3; 5,6-40,9)	0,190
anti-IL-17	2,5 ± 1,0 (2,1; 1,8-3,7)	1,5 ± 1,3 (1,3; 0,0-3,2)	0,393	2,0 ± 0,7 (2,3; 1,2-2,4)	0,9 ± 0,6 (0,8; 0,2-1,8)	0,071	18,8 ± 7,1 (18,6; 10,6-27,2)	29,5 ± 18,9 (37,2; 6,1-51,9)	0,556
Th17	1,4 ± 0,6 (1,3; 0,9-2,1)	2,0 ± 1,2 (2,5; 0,0-2,9)	0,250	1,2 ± 1,0 (1,4; 0,2-2,1)	1,0 ± 0,8 (0,9; 0,0-2,1)	0,571	32,6 ± 10,7 (31,1; 22,0-45,9)	32,0 ± 13,5 (32,6; 12,2-46,0)	0,905
Secukinumab	1,6 ± 0,2 (1,6; 1,4-1,7)	0,8 ± 0,3 (0,6; 0,5-1,1)	0,036	2,1 ± 0,6 (2,2; 1,4-2,6)	0,8 ± 0,3 (0,8; 0,4-1,1)	0,036	28,3 ± 12,8 (27,6; 17,3-40,9)	27,6 ± 10,3 (24,1; 18,4-41,7)	0,730

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Tabelle 30: Prozentuale Verteilung von IFN γ ⁺ und IL-17⁺ in CD4⁺-Zellen und Subpopulationen

	IFN γ ⁺ (%) in CD4 ⁺			IFN γ ⁺ (%) in CD4 ⁺ CCR6 ⁺			IFN γ ⁺ (%) in CD4 ⁺ FoxP3 ⁺		
	PSO	HC	p-Wert	PSO	HC	p-Wert	PSO	HC	p-Wert
unstimuliert	1,2 ± 0,8 (0,9; 0,6-2,3)	0,7 ± 0,4 (1,0; 0,1-1,0)	0,413	0,9 ± 0,6 (0,9; 0,4-1,5)	0,6 ± 0,5 (0,6; 0,1-1,3)	0,413	0,9 ± 1,5 (0,3; 0,0-3,1)	1,3 ± 1,0 (1,0; 0,2-2,9)	0,413
anti-CD3, anti-CD28	1,3 ± 0,5 (1,3; 0,7-1,9)	0,6 ± 0,4 (0,4; 0,2-1,0)	0,063	1,3 ± 0,7 (1,4; 0,4-2,1)	0,7 ± 0,8 (0,4; 0,0-1,8)	0,286	1,8 ± 1,4 (1,6; 0,5-3,6)	0,6 ± 0,7 (0,6; 0,0-1,4)	0,286
IL-17	1,6 ± 0,6 (1,5; 1,0-2,4)	0,7 ± 0,5 (0,5; 0,3-1,3)	0,111	1,7 ± 0,7 (1,5; 1,1-2,6)	1,0 ± 0,8 (0,5; 0,3-2,3)	0,190	2,4 ± 1,6 (2,0; 1,0-4,7)	1,4 ± 1,9 (0,4; 0,0-4,6)	0,286
anti-IL-17	1,1 ± 0,4 (1,1; 0,7-1,5)	0,7 ± 0,4 (0,5; 0,4-1,2)	0,190	1,2 ± 0,7 (1,2; 0,6-1,8)	1,1 ± 0,9 (0,7; 0,3-2,1)	1,000	2,2 ± 0,8 (2,2; 1,4-3,2)	1,2 ± 1,5 (0,7; 0,0-3,6)	0,221
Th17	1,4 ± 0,8 (1,6; 0,3-2,1)	0,7 ± 0,3 (0,6; 0,5-1,1)	0,286	1,6 ± 1,0 (1,5; 0,4-2,9)	0,7 ± 0,3 (0,7; 0,3-1,0)	0,190	1,2 ± 0,9 (1,4; 0,0-2,2)	0,6 ± 0,3 (0,4; 0,4-1,0)	0,286
Secukinumab	1,4 ± 0,7 (1,5; 0,5-2,3)	0,7 ± 0,5 (0,5; 0,3-1,5)	0,190	1,2 ± 0,8 (1,5; 0,0-1,8)	0,6 ± 0,6 (0,5; 0,0-1,6)	0,413	1,5 ± 1,3 (1,5; 0,0-2,9)	1,2 ± 1,5 (0,6; 0,0-3,7)	0,730
	IFN γ ⁺ IL-17 ⁺ (%) in CD4 ⁺			IFN γ ⁺ IL-17 ⁺ (%) in CD4 ⁺ CCR6 ⁺			IFN γ ⁺ IL-17 ⁺ (%) in CD4 ⁺ FoxP3 ⁺		
	PSO	HC	p-Wert	PSO	HC	p-Wert	PSO	HC	p-Wert
unstimuliert	0,4 ± 0,4 (0,4; 0,0-0,8)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0-0,2)	0,413	0,3 ± 0,2 (0,3; 0,0-0,5)	0,1 ± 0,2 (0,0; 0,0-0,3)	0,286	0,3 ± 0,7 (0,0; 0,0-1,3)	0,7 ± 1,3 (0,0; 0,0-2,9)	0,730
anti-CD3, anti-CD28	0,3 ± 0,2 (0,3; 0,0-0,5)	0,0 ± 0,1 (0,0; 0,0-0,1)	0,111	0,3 ± 0,2 (0,2; 0,0-0,5)	0,0 ± 0,0 (0,0; 0,0-0,0)	0,063	0,7 ± 0,9 (0,6; 0,0-1,8)	0,1 ± 0,3 (0,0; 0,0-0,6)	0,413
IL-17	0,4 ± 0,3 (0,4; 0,1-0,6)	0,1 ± 0,0 (0,1; 0,0-0,1)	0,063	0,5 ± 0,3 (0,4; 0,2-0,9)	0,0 ± 0,0 (0,0; 0,0-0,1)	0,016	0,5 ± 0,4 (0,5; 0,0-0,9)	0,3 ± 0,4 (0,1; 0,0-0,9)	0,556
anti-IL-17	0,3 ± 0,2 (0,3; 0,1-0,4)	0,1 ± 0,1 (0,0; 0,0-0,2)	0,063	0,2 ± 0,2 (0,3; 0,0-0,4)	0,1 ± 0,1 (0,0; 0,0-0,2)	0,190	0,9 ± 0,7 (1,0; 0,0-1,6)	0,5 ± 1,1 (0,0; 0,0-2,4)	0,413
Th17	0,3 ± 0,3 (0,4; 0,0-0,6)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,1-0,2)	0,190	0,3 ± 0,3 (0,3; 0,0-0,6)	0,1 ± 0,1 (0,0; 0,1-0,3)	0,286	0,4 ± 0,4 (0,5; 0,0-0,8)	0,1 ± 0,2 (0,0; 0,0-0,5)	0,190
Secukinumab	0,4 ± 0,5 (0,3; 0,0-1,1)	0,1 ± 0,1 (0,1; 0,0-1,1)	0,556	0,3 ± 0,3 (0,3; 0,0-0,6)	0,0 ± 0,1 (0,0; 0,0-0,2)	0,190	0,8 ± 1,0 (0,5; 0,0-2,2)	0,3 ± 0,3 (0,2; 0,0-0,7)	0,556

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

3.2 Suppressionsfähigkeit der Tregs bei PSO und HC

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Suppressionsversuche dargestellt. Hierfür werden zunächst die Proliferation und die Inhibition bei HC und im Weiteren bei PSO dargestellt. Anschließend erfolgt der Vergleich der beiden Gruppen.

Da in den unterschiedlichen Stimuli zusätzlich anti-CD3 und anti-CD28 hinzugefügt wurde, erfolgt der Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test immer im Vergleich zur positiven Kontrolle (anti-CD3/CD28).

3.2.1 Kollektiv der PSO und HC des Suppressionsversuchs

In Tabelle 31 und Tabelle 32 finden sich die demografischen und klinischen Daten der Studienpopulation des Suppressionsversuchs.

Tabelle 31: Demografische Daten von PSO und HC des Suppressionsversuchs.

	PSO	HC
Anzahl an Proben	4	5
Anzahl an Männern	2 (50%)	5 (100%)
/ Frauen (in %)	2 (50%)	0 (0%)
Alter am Tag des Studieneinschlusses (Jahre)	48,3 ± 2,1 (49; 45-50)	23,2 ± 0,8 (22,5; 22-25)
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	20,8 ± 7,3 (20,5; 13-29)	
Dauer der Erkrankung (Jahre)	27,5 ± 6,8 (27,5; 19-36)	

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum). PSO = Psoriasis, HC = Gesunde Kontrolle)

Tabelle 32: Klinische Daten der PSO des Suppressionsversuchs.

Fumarsäure	1 (25%)		
Methotrexat (10-20 mg/m²/Woche)	1 (25%)		
Biologika (in therapeutischer Dosierung)	2 (50%)	Ustekinumab	1 (25%)
		Secukinumab	1 (25%)
PASI (Psoriasis Area and Severity Index)	2,3 ± 2,1		
	1,4; (0,5-5,8)		
CRP (C-reaktives Protein) (mg/dl)	0,3 ± 0,1		
	0,3; (0,3-0,4)		
Leukozyten x10³ /µl (Normwert 4.8-10)	5,9 ± 1,2		
	5,3; (4,9-7,9)		
Lymphozyten x10³ /µl (Normwert 1-4.05)	1,3 ± 0,5		
	1,3; (0,7-2,1)		
Lymphozyten in %	23,0 ± 9,0		
	20,0; (14-37)		
Thrombozyten x10³ /µl (Normwert 150-450)	227,8 ± 40,6		
	225; (178-284)		

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum).

3.2.2 Reinheit der Tregs nach MACS

Abbildung 39 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Messung der Reinheit nach der Treg-Isolierung bei PSO und HC im Rahmen der Suppressionsversuche. In Tabelle 33 wird diese Reinheit numerisch dargestellt. Zwischen der Reinheit von PSO und HC zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

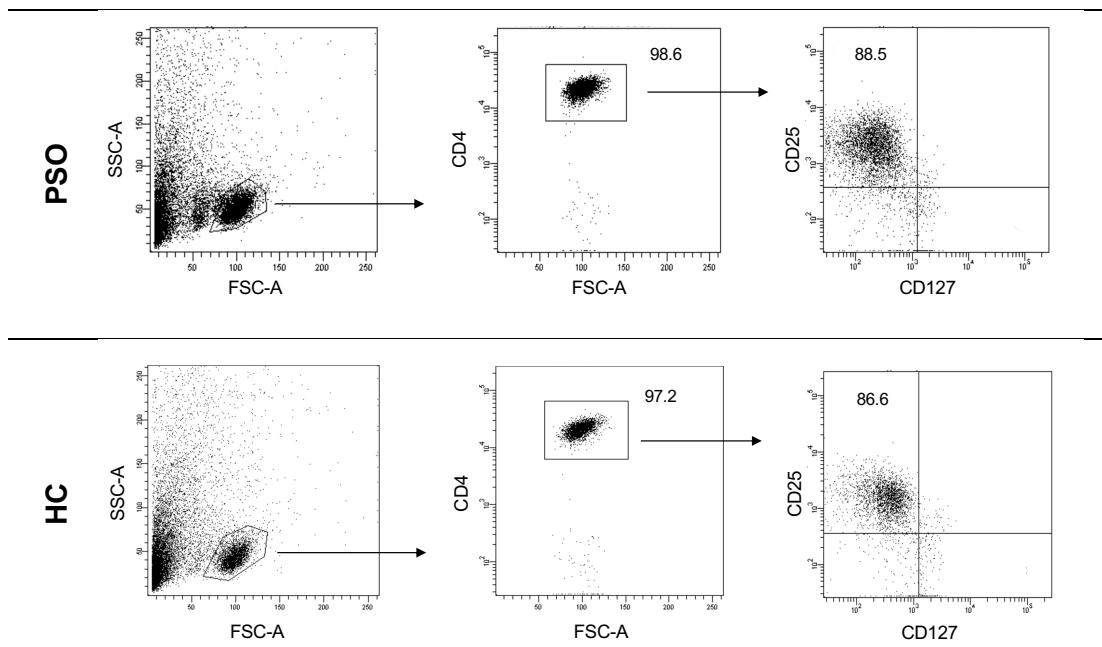


Abbildung 39: Reinheitsmessung nach Treg-Isolierung bei PSO und HC.

Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der Reinheit nach Treg-Isolierung bei PSO und HC mit der Treg-Definition $CD4^+CD25^+CD127^-$ und der prozentualen Angabe der Tregs im Vergleich zur Gesamtzellzahl. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Tabelle 33: Reinheit der Tregs nach Isolierung.

	PSO	HC	p-Wert
Reinheit der Tregs (in %)	82,5 ± 7,2 (87; 71,8-89,6)	76,9 ± 13,5 (79,7; 45,9-91,2)	0,610

In der Tabelle wird die Reinheit der Tregs für die Suppressionsversuche nach der Zellseparation aufgeteilt in PSO und HC aufgelistet. Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum). PSO = Psoriasis, HC = Gesunde Kontrolle)

3.2.3 Ergebnisse Suppressionsversuch in HC

In den folgenden Unterkapiteln folgt zunächst die Darstellung des Suppressionsversuchs der gesunden Kontrollen.

3.2.3.1 Proliferation der PBMCs in HC

In der Proliferation der PBMCs bei HC konnte in der Zellkultur ohne Tregs (1:0) und mit Tregs (1:1) außer im Vergleich zur Negativkontrolle kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Negativkontrolle zeigte eine signifikante Reduktion der Proliferation der PBMCs ohne Tregs in der Zellkultur (s. Abbildung 40). In der Proliferation der PBMCs zeigte sich im Ansatz mit Tregs im Th17-Milieu eine erhöhte Proliferation im Vergleich zu den anderen Stimulationen (nicht signifikant).

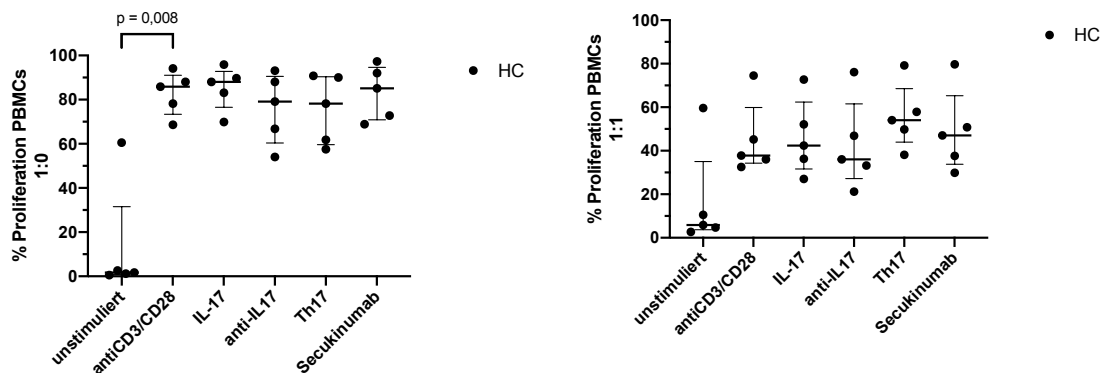


Abbildung 40: Proliferation der PBMCs ohne Tregs (1:0) und mit Tregs (1:1) in HC

Prozentuelle Angabe der Proliferation von PBMCs mit und ohne Tregs in der Zellkultur mit verschiedenen Stimulationen bei HC mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle.

3.2.3.2 Inhibition der Tregs in HC

Der Vergleich der Ansätze mit Tregs und ohne Tregs, um eine Inhibition der PBMCs festzustellen erfolgte nach der Rechenformel in Kapitel 2.2.8.4 .

Hierbei konnte in der Negativkontrolle eine signifikant verminderte Inhibition im Vergleich zur Positivkontrolle gezeigt werden.

In der Stimulation mit IL-17, anti-IL-17 und Secukinumab konnte im Vergleich zur positiven Kontrolle kein Unterschied gesehen werden. Durch die Stimulation im Th17-Milieu wird tendenziell eine geringere Inhibition der PBMCs erreicht, wenn auch nicht statistisch signifikant (Vgl. Abbildung 41, Tabelle 34).

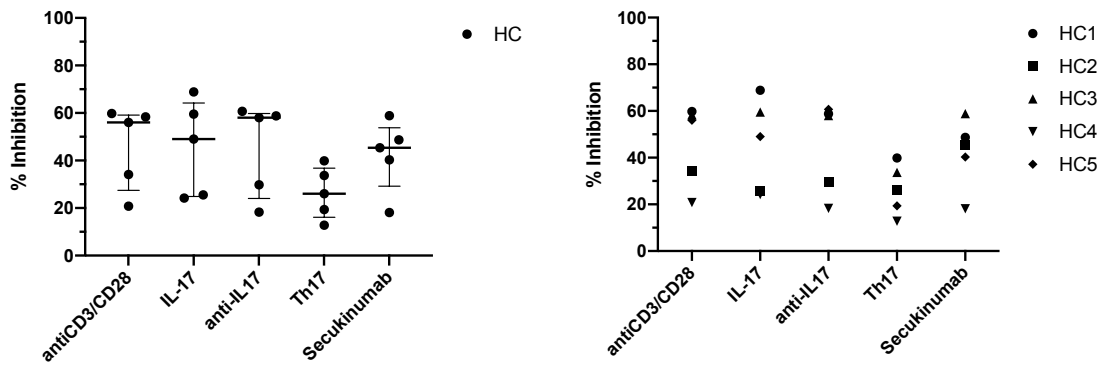


Abbildung 41: Inhibition der Tregs in der HC.

Prozentuale Angabe der Inhibition von PBMCs in der Kokultur mit verschiedenen Stimulationen bei HC mit Median und Interquartilabstand. In der rechten Abbildung werden die unterschiedlichen HC mit verschiedenen Symbolen dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Tabelle 34: Proliferation und Inhibition der Tregs in unterschiedlichen Stimuli in Vergleich zur positiven Kontrolle.

Stimulus		HC	p-Wert
unstimuliert	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	13,3 ± 26,4 (1,7; 0,5-60,5)	0,008
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	16,6 ± 24,2 (5,9; 2,7-59,6)	0,095
	Inhibition der PBMC- Proliferation	-302,9 ± 322,5 (-247,1; -840-1,5)	0,008
anti-CD3, anti-CD28	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	83,0 ± 9,8 (85,9; 68,6-94,1)	-
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	45,2 ± 17,0 (37,8; 32,5-74,5)	-
	Inhibition der PBMC- Proliferation	45,8 ± 17,5 (56; 20,8-59,8)	-
IL-17	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	85,3 ± 9,8 (88,0; 69,9-95,0)	0,548
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	46,1 ± 17,5 (42,4; 27,0-72,7)	1,000

	Inhibition der PBMC-Proliferation	45,4 ± 20,1 (49,0; 24,2-68,9)	1,000
anti-IL-17	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	76,2 ± 15,9 (79,1; 54,0-93,1)	0,548
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	42,7 ± 36,0 (20,8; 21,2-76,1)	0,841
	Inhibition der PBMC-Proliferation	45,1 ± 19,7 (58,0; 18,3-60,7)	1,000
Th17	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	75,7 ± 15,5 (78,2; 57,5-90,8)	0,548
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	55,8 ± 15,0 (54,0; 38,1-79,2)	0,151
	Inhibition der PBMC-Proliferation	26,4 ± 10,8 (26,0; 12,8-39,9)	0,095
Secukinumab	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	83,2 ± 12,2 (85,1; 68,9-97,3)	1,000
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	49,0 ± 19,0 (47,0; 29,9-79,7)	0,690
	Inhibition der PBMC-Proliferation	42,3 ± 15,1 (45,4; 18,1-58,9)	0,690

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

3.2.4 Ergebnisse Suppressionsversuch in PSO

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse des Suppressionsversuchs bei PSO dargestellt.

3.2.4.1 Proliferation der PBMCs in PSO

Die Proliferation der PBMCs in PSO zeigte, ähnlich zu HC, keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Stimulationen in den Zellkulturen mit Tregs und ohne Tregs. Lediglich in der negativen Kontrolle konnte ein signifikanter Unterschied zur positiven Kontrolle dargestellt werden.

Tendenziell konnte eine leicht geringere Proliferation der PBMCs im Th17-Milieu in der Zellkultur ohne Tregs gezeigt werden. In der Zellkultur mit Tregs zeigte sich die Proliferation der PBMCs im Th17-Milieu hingegen ähnlich wie in der Kontrollgruppe erhöht (nicht signifikant, vgl. Abbildung 42 und Tabelle 35)

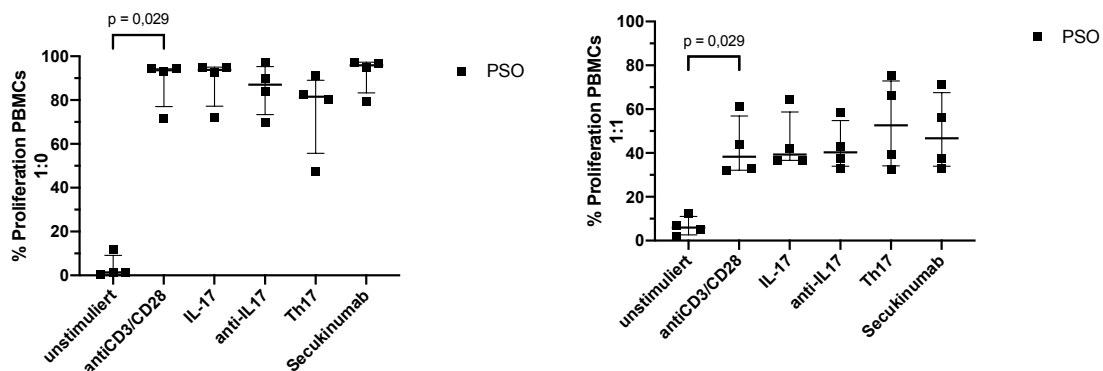


Abbildung 42: Proliferation der PBMCs ohne Tregs (1:0) und mit Tregs (1:1) in PSO.

Prozentuale Angabe der Proliferation von PBMCs mit und ohne Tregs in der Kokultur mit verschiedenen Stimulationen bei PSO mit Median und Interquartilabstand. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.2.4.2 Inhibition der Tregs in PSO

Analog zu Kapitel 3.2.3.2 erfolgte die Errechnung der Inhibition. Hierbei konnte in der Negativkontrolle ebenfalls wie bei gesunden Kontrollen eine fehlende Inhibition der PBMCs gezeigt werden.

Für das Th17-Milieu konnte ähnlich zu HC eine verminderte Inhibition der PBMCs in PSO dargestellt werden, auch wenn diese nicht signifikant war. Die übrigen Stimulationen zeigten im Vergleich zur positiven Kontrolle keine Tendenz zu einer erhöhten oder verminderten Inhibition (Vgl. Abbildung 43, Tabelle 35).

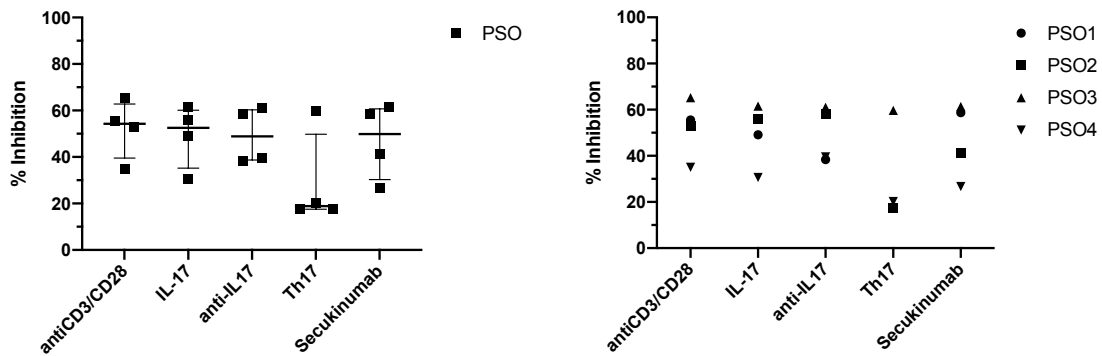


Abbildung 43: Inhibition der Tregs in PSO.

Prozentuale Angabe der Inhibition von PBMCs in der Kokultur mit verschiedenen Stimulationen bei PSO mit Median und Interquartilabstand. In der rechten Abbildung werden die unterschiedlichen PSO mit verschiedenen Symbolen dargestellt. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Tabelle 35: Proliferation und Inhibition der PBMCs in PSO im Vergleich zur positiven Kontrolle.

Stimulus		PSO	p-Wert
unstimuliert	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	3,7 ± 5,4 (1,4; 0,3-11,7)	0,029
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	8,1 ± 3,1 (7,4; 5,2-12,5)	0,029
	Inhibition der PBMC- Proliferation	-529,6 ± 765,1 (-239,2; -1633,3- -6,8)	0,029
anti-CD3, anti-CD28	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	88,3 ± 11,1 (93,7; 71,7-94,3)	-
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	42,4 ± 13,7 (38,3; 31,9-61,3)	-
	Inhibition der PBMC- Proliferation	52,2 ± 12,6 (54,3; 35,0-65,2)	-
IL-17	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	88,7 ± 11,1 (93,8; 72,1-95,0)	0,686
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	44,9 ± 13,2 (39,3; 36,6-64,3)	0,686
	Inhibition der PBMC- Proliferation	49,3 ± 13,4 (52,5; 30,6-61,5)	0,886

anti-IL-17	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	85,3 ± 11,6 (87,1; 69,8-97,1)	0,686
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	43,0 ± 11,3 (40,3; 32,8-58,7)	1,000
	Inhibition der PBMC- Proliferation	49,3 ± 12,0 (48,9; 38,4-61,0)	1,000
Th17	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	75,5 ± 19,2 (81,6; 47,5-91,2)	0,200
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	53,2 ± 20,6 (52,6; 32,4-75,2)	0,486
	Inhibition der PBMC- Proliferation	28,7 ± 20,7 (18,9; 17,5-59,7)	0,200
Secukinumab	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	92,2 ± 8,6 (95,9; 79,4-97,4)	0,200
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	49,4 ± 17,8 (46,7; 32,8-71,4)	0,486
	Inhibition der PBMC- Proliferation	47,0 ± 16,2 (49,9; 26,7-61,4)	0,886

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen den Patienten mit Psoriasis (PSO) und gesunden Kontrollen (HC) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

3.2.5 Ergebnisse des Suppressionsversuchs im Vergleich zwischen PSO und HC

Nach dem Vergleich der Proliferation und Inhibition der PBMCs innerhalb der PSO und HC erfolgt in den folgenden Unterkapiteln der Vergleich der Patienten und Gesunden Kontrollen untereinander.

3.2.5.1 Proliferation der PBMCs vergleichend PSO und HC

Im Vergleich der Proliferation der PBMCs konnte zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Tendenziell zeigte sich eine gering erhöhte Proliferation der PBMCs in PSO insbesondere unter anti-IL-17 und Secukinumab ohne Tregs. Im Th17-Milieu ohne Tregs zeigte sich eher eine geringere Proliferation der PBMCs bei PSO.

Auch im Ansatz mit Tregs kann dieser Trend zur leicht erhöhten Proliferation der PBMCs bei PSO in allen Ansätzen bis auf das Th17-Milieu nachvollzogen werden (Vgl. Abbildung 44).

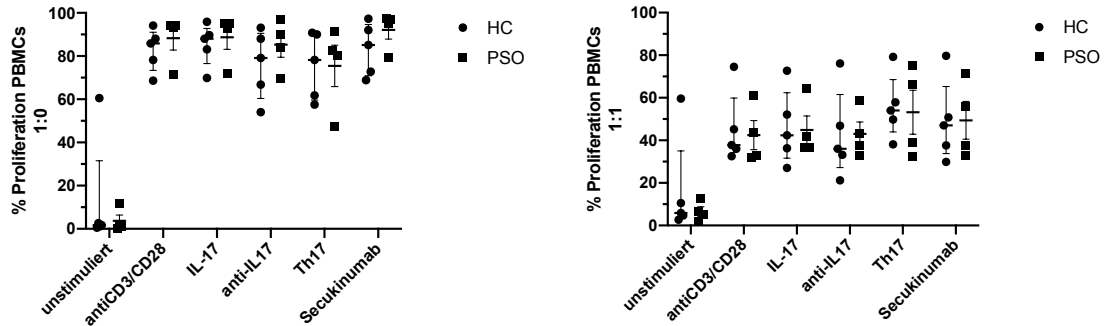


Abbildung 44: Proliferation der PBMCs ohne Tregs (1:0) und mit Tregs (1:1) in PSO und HC

Prozentuale Angabe der Proliferation von PBMCs mit und ohne Tregs in der Kokultur mit verschiedenen Stimulationen bei PSO und HC mit Median und Interquartilabstand. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

3.2.5.2 Inhibition der PBMCs vergleichend bei Patienten und Kontrollen

Im Vergleich der Inhibition der PBMCs innerhalb der zwei Kohorten konnte kein signifikanter Unterschied dargestellt werden (Vgl. Abbildung 45).

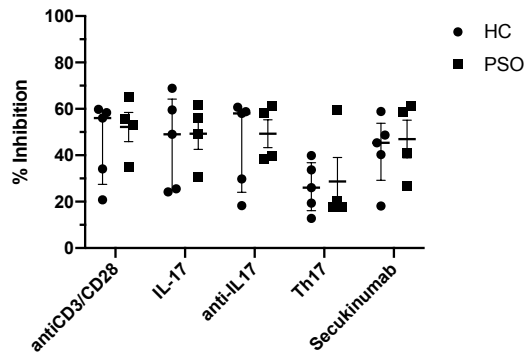
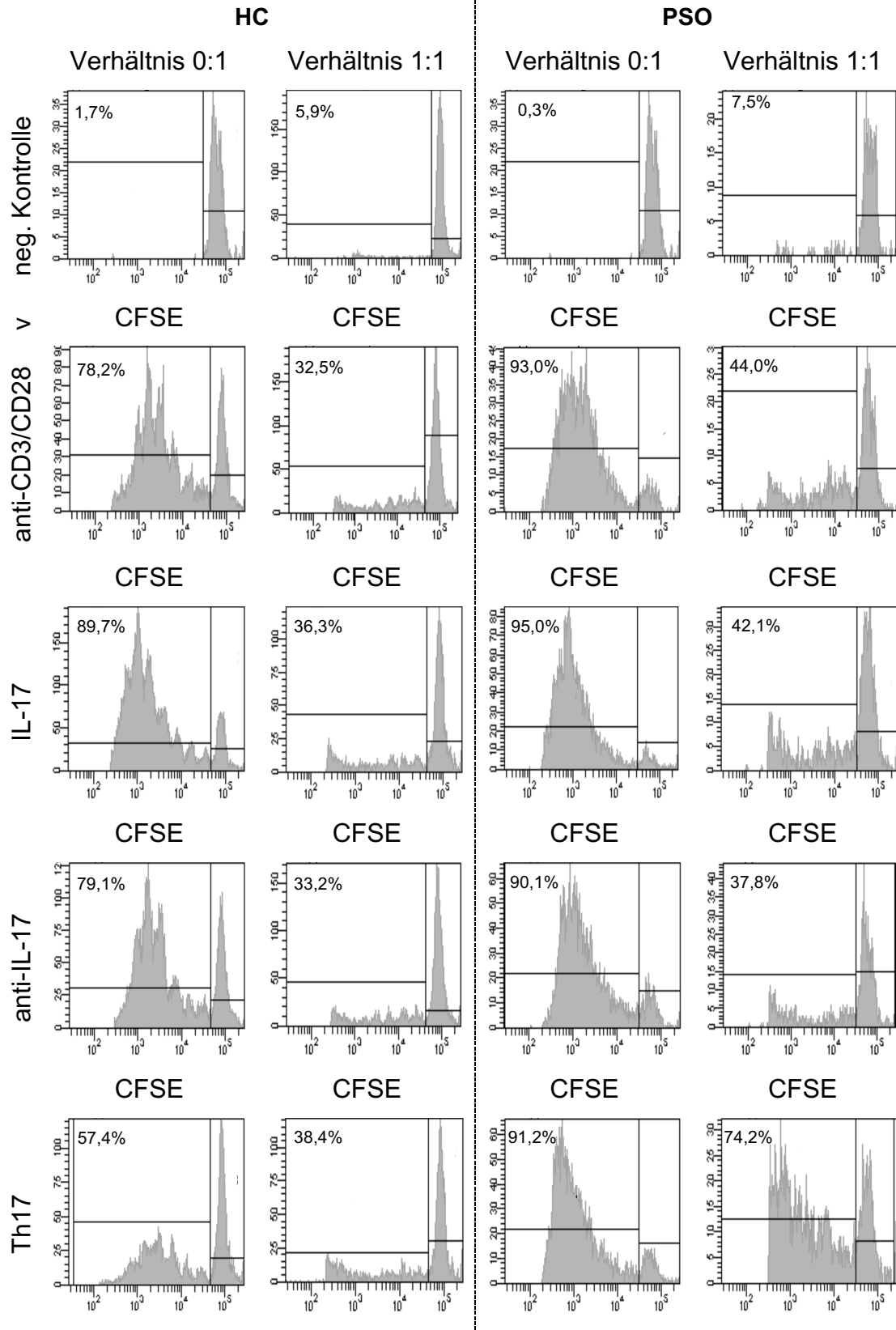
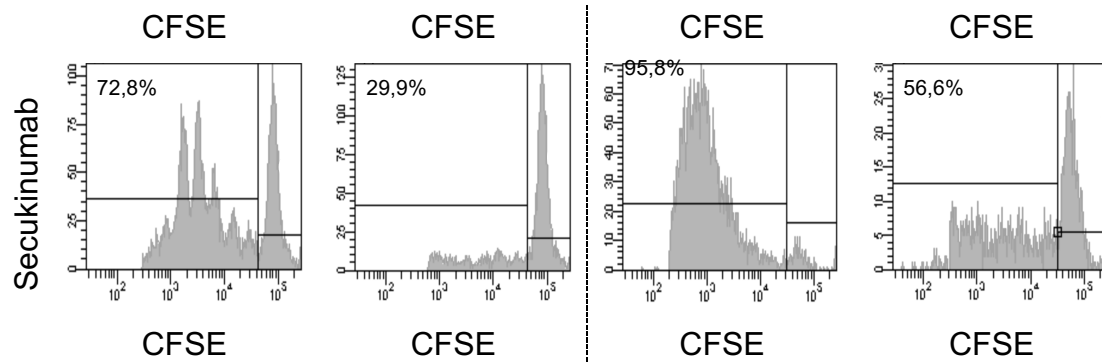


Abbildung 45: Inhibition der Tregs in der Patienten- und Kontrollkohorte

Prozentuale Angabe der Inhibition von PBMCs in der Kokultur mit verschiedenen Stimulationen bei PSO und HC mit Median und Interquartilabstand. HC = gesunde Kontrolle, PSO = Psoriasis.

Tabelle 36: Repräsentatives Beispiel des Suppressionsversuchs bei HC und PSO.





Darstellung einer FACS-Analyse der Proliferationsmessung von PBMCs. Ein zunehmender Verlust an Fluoreszenzaktivität spiegelt dabei die Proliferation der PBMCs wider. Die Angabe der Proliferation erfolgt prozentual zur Gesamtzahl an PBMCs in der Kultur. Die Durchführung der Proliferationsversuche erfolgte unter Zugabe verschiedener Stimulationen, die links in der Zeile stehen. Auf der x-Achse wurde die Fluoreszenzaktivität gemessen, auf der y-Achse die Zellzahl (HC = Gesunde Kontrolle, PSO = Patient mit Psoriasis).

3.3 Suppressionsversuch unter proinflammatorischem Milieu und Secukinumab

In folgenden Unterkapiteln wurde der Suppressionsversuch anhand von HC (Vgl. Tabelle 37) die Proliferation und Inhibition von PBMCs bei proinflammatorischem Milieu mit Secukinumab wiederholt.

3.3.1 Demografische Daten der Kohorte

Tabelle 37: Demografische Daten des Suppressionsversuchs unter proinflammatorischem Milieu mit Secukinumab

HC		
Anzahl an Proben	4	
Anzahl an Männern	4 (100%)	
/ Frauen (in %)	0 (0%)	
Alter am Tag des Studieneinschlusses	23,5 ± 1,1 (23,5; 22-25)	
	Geschlecht	Alter bei Studieneinschluss (Jahre)
HC5	männlich	22
HC6	männlich	25
HC7	männlich	24
HC8	männlich	23

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum). HC = Gesunde Kontrolle.

3.3.2 Proliferation der PBMCs

Bei der Proliferation der PBMCs ohne Tregs konnte zwischen den verschiedenen Stimulationen ähnlich zum vorherigen Versuch kein Unterschied gezeigt werden. In der Zellkultur unter Zugabe von Tregs zeigte sich sowohl bei Stimulation mit Th17 als auch bei Stimulation mit Th17 und Secukinumab eine erhöhte

Proliferation der PBMCs im Vergleich zur positiven Kontrolle (statistisch nicht signifikant). Grafisch wird die Proliferation in Abbildung 46 dargestellt.

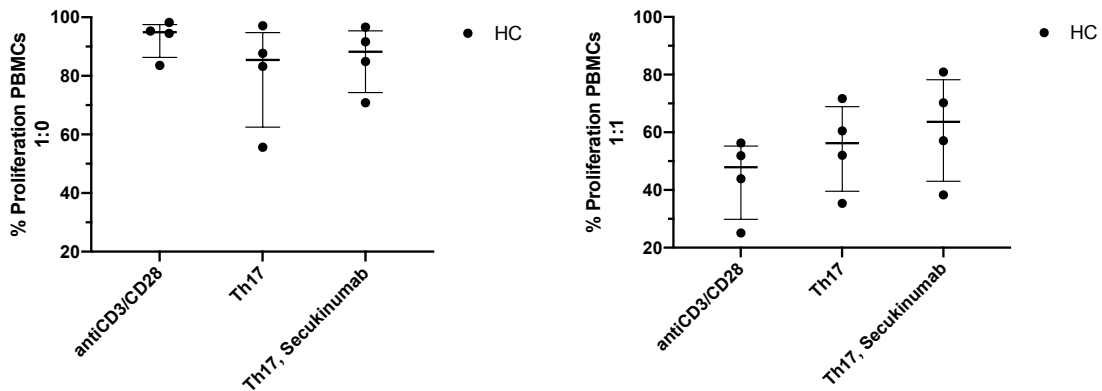


Abbildung 46: Proliferation der PBMCs ohne Tregs (1:0) und mit Tregs (1:1) in Th17-Milieu und Th17 mit Secukinumab.

Prozentuelle Angabe der Proliferation der PBMCs mit und ohne Tregs unter verschiedenen Stimulationen mit Median und Interquartilabstand. HC = gesunde Kontrolle.

3.3.3 Suppression der Tregs mit und ohne Secukinumab

Nach Errechnung der Inhibition, wie auch im vorigen Suppressionsversuch beschrieben, ergab sich eine signifikante ($p = 0,029$) Verringerung der Inhibition von PBMCs im Ansatz mit Th17 im Vergleich zur positiven Kontrolle. Dies konnte bereits im vorherigen Versuch gezeigt werden, wenn auch dort nicht statistisch signifikant.

Unter Zugabe von Secukinumab zum Th17-Milieu konnte in dieser Zellkultur ebenfalls eine Verminderung der Inhibition von Tregs gezeigt werden (nicht statistisch signifikant, Vgl. Abbildung 47, Tabelle 38).

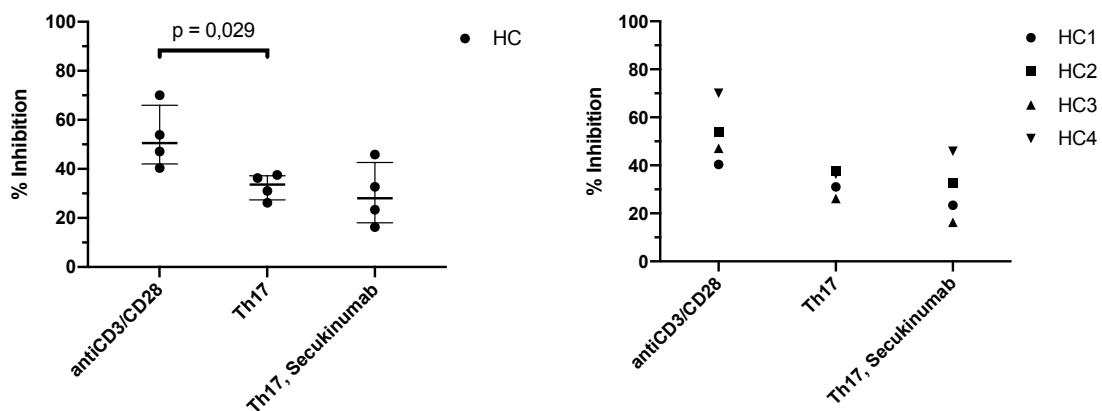


Abbildung 47: Inhibition der PBMCs unter Th17 und Th17 mit Secukinumab.

Prozentuelle Angabe der Inhibition der PBMCs unter verschiedenen Stimulationen mit Median und Interquartilabstand. In der rechten Grafik werden zudem die einzelnen HC mit verschiedenen Symbolen dargestellt. Über der Klammer sind die signifikanten p-Werte ($p < 0,05$) dargestellt. HC = gesunde Kontrolle.

Tabelle 38: Proliferation und Inhibition der PBMCs von HC in Th17-Milieu und Th17 mit Secukinumab.

Stimulus			p-Wert
anti-CD3, anti-CD28	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	92,9 ± 6,4 (94,9; 83,6-98,2)	-
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	44,3 ± 13,8 (47,9; 25,1-56,3)	-
	Inhibition der PBMC- Proliferation	52,9 ± 12,7 (50,5; 40,4-70,0)	-
Th17	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	80,9 ± 17,8 (85,5; 55,6-97,1)	0,343
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	54,9 ± 15,3 (56,3; 35,4-71,7)	0,343
	Inhibition der PBMC- Proliferation	32,8 ± 5,2 (33,7; 26,2-37,5)	0,029
Th17, Secukinumab	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:0	86,0 ± 11,2 (88,3; 70,8-96,6)	0,486
	Proliferation PBMCs Verhältnis 1:1	61,6 ± 18,3 (63,7; 38,3-80,9)	0,200
	Inhibition der PBMC- Proliferation	29,6 ± 12,8 (28,1; 16,3-45,9)	0,057

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen der positiven Kontrolle und den Stimuli mit Th17 oder Th17 und Secukinumab wurden dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

3.4 Treg-Stimulationsversuch

Die Ergebnisse des Suppressionsversuchs mit zuvor stimulierten Zellen werden in folgendem dargestellt.

3.4.1 Demografische Daten der Kohorte

Tabelle 39: Demografische Daten des Treg-Stimulationsversuch.

		HC
Anzahl an Proben		2
Anzahl an Männern		1 (50%)
/ Frauen (in %)		1 (50%)
Alter am Tag des Studieneinschlusses		23,0 ± 1,0 (23,0; 22-24)
	Geschlecht	Alter bei Studieneinschluss (Jahre)
HC5	männlich	22
HC12	weiblich	24

Die Werte sind angegeben in absoluten Zahlen (Prozentwerten) oder als Mittelwert ± Standardabweichung (Median, Minimum-Maximum). PSO = Psoriasis, HC = Gesunde Kontrolle)

3.4.2 Proliferation der PBMCs

In der Proliferation der PBMCs im Vergleich zeigte sich zwischen der Stimulation mit anti-CD3/CD28 und der Zellkultur mit zusätzlich Secukinumab kein Unterschied. Die PBMCs mit Tregs, welche zuvor mit Th17 stimuliert wurden, zeigten nur eine minimal geringere Proliferation. In der Zellkultur mit IL-2 stimulierten Tregs konnte hingegen eine deutlich geringere Proliferation der PBMCs dargestellt werden, wenn auch bei der geringen Anzahl der Probanden nicht statistisch signifikant (Vgl. Abbildung 48, Tabelle 41).

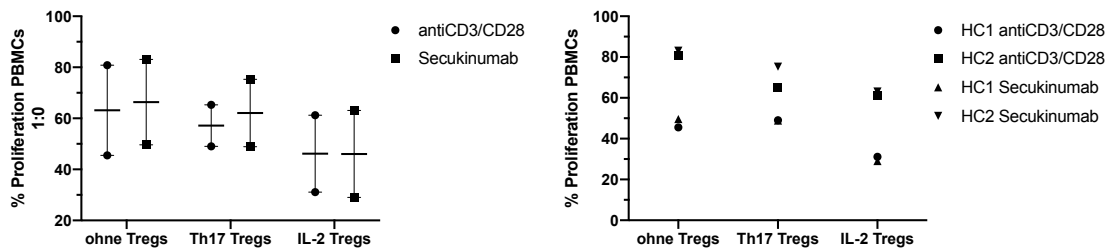


Abbildung 48: Proliferation der PBMCs in unterschiedlichen Milieu nach Stimulation der Treg-Zellen.

Prozentuale Angabe der Proliferation der PBCMS in Abhängigkeit der Kokultur mit unterschiedlich stimulierten Tregs und ohne Tregs in Zellkultur mit antiCD3/CD28 und Secukinumab mit Median und Interquartilabstand. In der rechten Grafik zudem Darstellung der einzelnen HC mit unterschiedlichen Symbolen. HC = gesunde Kontrolle.

3.4.3 Inhibition der PBMCs durch unterschiedliche Tregs

Die Errechnung der Inhibition erfolgt anhand der Zellkultur ohne Tregs als positive Kontrolle nach dem Rechenweg, welcher in Kapitel 2.2.8.6 beschrieben ist.

Hierbei zeigte sich bei dem Ansatz mit Th17 vorstimulierten Tregs eine nahezu vollständig fehlende Inhibition im Vergleich zum Ansatz der IL-2 vorstimulierten Tregs (nicht signifikant). Zwischen der Stimulation mit anti-CD3/CD28 und zusätzlich Secukinumab konnte kein Unterschied festgestellt werden (Vgl. Abbildung 49, Tabelle 41)

Das Verhältnis der PBMCs zu den Tregs innerhalb der Zellkultur wird in Abbildung 49 dargestellt. Hierbei zeigt sich eine deutliche geringere Anzahl an Tregs im Vergleich zu PBMCs im Ansatz der Th17 vorstimulierten Zellen.

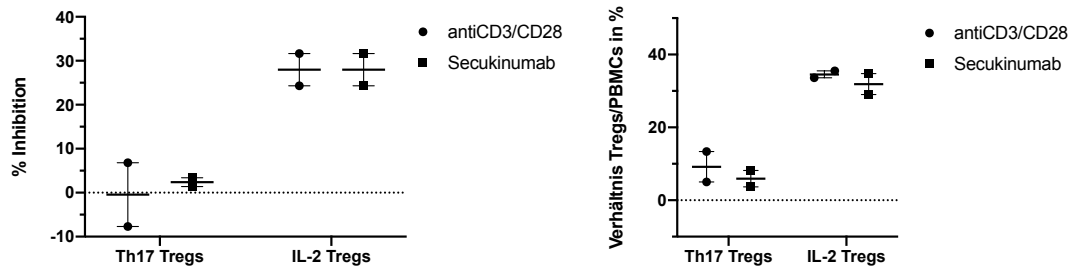
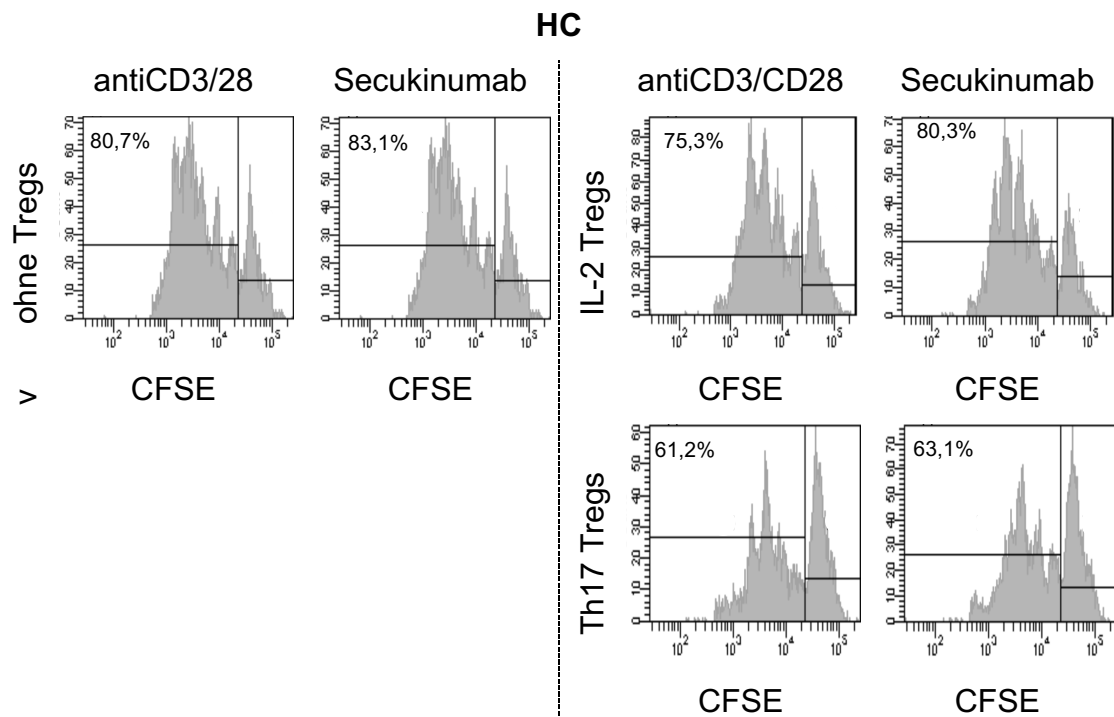


Abbildung 49: Inhibition der PBMCs in unterschiedlichen Milieu nach Stimulation der Treg-Zellen und Verhältnis der Tregs zu PBMCs.

Prozentuale Angabe der Inhibition der PBMCs bei zuvor mit IL-2 oder Th17 stimulierten Tregs unter Kultivierung mit antiCD3/CD28 oder Secukinumab mit Median und Interquartilabstand. In der rechten Grafik erfolgt die Darstellung des Verhältnisses von Tregs gegenüber PBMCs in der Kokultur.

Tabelle 40: Repräsentatives Beispiel von Histogrammen einer Kontrolle des Suppressionsversuches mit vorstimulierten Tregs.



Darstellung einer FACS-Analyse der Proliferationsmessung von PBMCs. Ein zunehmender Verlust an Fluoreszenzaktivität spiegelt dabei die Proliferation der PBMCs wider. Die Angabe der Proliferation erfolgt prozentual zur Gesamtzahl an PBMCs in der Kultur. Die Durchführung der Proliferationsversuche erfolgte unter Zugabe unterschiedlich stimulierter Tregs wie in der linken Zeile beschrieben. Auf der x-Achse wurde die Fluoreszenzaktivität gemessen, auf der y-Achse die Zellzahl. (HC = Gesunde Kontrolle)

Tabelle 41: Proliferation und Inhibition von PBMCs bei vorstimulierten Tregs unter verschiedenen Stimuli.

Stimulus	Tregs		PSO	p-Wert
anti-CD3, anti-CD28	ohne Tregs	Proliferation PBMCs	63,2 ± 25,0 (63,2; 45,5-80,8)	-
		Inhibition PBMCs	-	-
Secukinumab		Proliferation PBMCs	66,4 ± 23,7 (66,4; 49,6-83,1)	-
		Inhibition PBMCs	-	-
anti-CD3, anti-CD28	Th17-Tregs	Proliferation PBMCs	57,2 ± 11,5 (57,2; 49,0-65,3)	1,000
		Inhibition PBMCs	-0,4 ± 10,2 (-0,4; -7,7-6,8)	0,333
Secukinumab		Proliferation PBMCs	39,0 ± 14,1 (39,0; 29,0-48,9)	0,333
		Inhibition PBMCs	2,4 ± 1,4 (2,4; 1,4-3,4)	0,333
anti-CD3, anti-CD28	IL-2-Tregs	Proliferation PBMCs	46,2 ± 21,3 (46,2; 31,1-61,2)	0,667
		Inhibition PBMCs	28,0 ± 5,2 (28,0; 24,3-31,7)	0,333
Secukinumab		Proliferation PBMCs	69,2 ± 8,6 (69,2; 63,1-75,3)	1,000
		Inhibition PBMCs	32,8 ± 12,3 (32,8; 24,1-41,5)	0,333

Die Werte sind dargestellt in absoluten Zahlen (Prozentzahlen) oder als Mittelwerte ± Standardabweichung (Median; Minimum – Maximum) Die Werte zwischen dem Ansatz ohne Tregs und den vorstimulierten Tregs wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

4 Diskussion

4.1 Interpretation der Unterschiede im Lymphozytenpool von PSO und HC

Im Rahmen der PBMC-Charakterisierung erfolgte der Vergleich und die Interpretation der Lymphozytenverteilung in peripherem Blut von HC und PSO.

4.1.1 Unterschiede der Chemokinrezeptoren und T-Zellsubpopulationen

Im Vergleich der Subpopulationen der T-Zellen erfolgte zunächst die Aufteilung der T-Zellen in Naive-, Memory-, TEMRA-, und Effektor-Zellen anhand der Oberflächenmarker CD45RA und CD27.

Die erhöhte Anzahl an naiven T-Zellen bei HC im Vergleich zu PSO zeigte eine vermehrte Aktivierung und Differenzierung zu Memory und Effektor-Zellen. Eine erniedrigte Anzahl an naiven T-Zellen konnte als Zeichen der Inflammation bei Psoriasis in anderen Studien gezeigt werden [88]. Ebenfalls könnte das niedrige Alter bei HC eine Ursache der erhöhten Anzahl von naiven T-Zellen sein, da es im Alter zu einer Verschiebung von naiven T-Zellen hin zu Memory- und Effektor-Zellen kommt [89].

In der Subpopulation der Memory-Zellen konnte tendenziell eine Erhöhung bei PSO im Vergleich zu HC gezeigt werden. Memory-Zellen können weiter in Zentrale-Memory-Zellen und Effektor-Memory-Zellen aufgeteilt werden, welche sich anschließend zu Effektor-Zellen differenzieren können [1]. Auch in der Literatur konnte insbesondere innerhalb der CD8⁺-Memory-Zellen und speziell der Effektor-Memory-Zellen eine Vermehrung bei PSO festgestellt werden [88, 90].

Die Funktion der TEMRA-Zellen ist in der Literatur noch nicht eindeutig geklärt. Die Anzahl an TEMRA-Zellen ist innerhalb der Allgemeinbevölkerung zwischen 0,3% und 18% Anteil an der T-Zellsubpopulation sehr unterschiedlich [91]. Im peripheren Blut konnten bei PSO erniedrigte Werte im Vergleich zu HC

festgestellt werden, auch wenn weitere Funktionen der TEMRA-Zellen bei Psoriasis nicht geklärt sind [88]. Diese prozentuelle Verkleinerung der differenzierten Effektor-T-Zellen könnte bei PSO allerdings auch therapieinduziert und somit ein therapeutisch erwünschter Effekt sein, da keiner der PSO therapie-naiv war und sich alle in einer niedrigen Aktivitätsphase der Erkrankung befanden.

Für die Expression von CCR6 konnte in unserer Population kein Unterschied zwischen PSO und den HC gezeigt werden. Generell konnte innerhalb der naiven T-Zellen kaum eine Expression dargestellt werden und ebenfalls nur eine geringe Expression innerhalb der TEMRA, was sich mit der Literatur deckt [92]. In Memory-Zellen, insbesondere in Effektor-Memory-Zellen, und in Effektor-Zellen konnte eine Expression von CCR6 nachgewiesen werden, welche innerhalb der CD8⁺-Zellen bei PSO im Vergleich zu HC vermindert ist. In der Literatur konnten in Studien erhöhte Werte von CCR6 in PBMCs bei PSO im Vergleich zu HC nachgewiesen werden [93, 94]. CCR6 ist ein Chemokinrezeptor, welcher unter anderem auf Th17-Zellen zu finden ist, welche wiederum als ein Haupttreiber für Psoriasis und andere Immunerkrankungen verantwortlich gemacht werden [95]. So konnten andere Studien auch zeigen, dass die CCR6-Expression mit der Schwere der systemischen Erkrankung korreliert und eine Therapie zu einer Erniedrigung der CCR6⁺-Zellen und einer Verringerung des PASI-Wertes führt [96, 97]. In Mausmodellen wurde bereits ein CCR6-Antikörper erfolgreich eingesetzt, welcher die Inflammationszeichen bei Mäusen mit Psoriasis deutlich reduzierte [98]. Auch bei Menschen wird eine solche Therapiemöglichkeit in der Literatur diskutiert [94].

Für die Erniedrigung der CCR6⁺-Expression in unserem Patientenkollektiv ist die hohe Anzahl an sich bereits in Therapie befindlicher Patienten ein möglicher Erklärungsansatz. Des Weiteren zeigten sich in unserem Kollektiv nur ein niedriger PASI-Wert sowie geringe CRP-Werte als Zeichen einer nur milden Krankheitsaktivität, wodurch sich therapie-bedingt eine reduzierte CCR6⁺-Expression zeigen könnte [99].

CXCR3⁺-Zellen waren in unserer Population sowohl bei CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen bei PSO im Vergleich zu HC erniedrigt. Auch in der Literatur zeigt

sich bei PSO in peripherem Blut eine geringere Expression von CXCR3 [96, 100]. Ebenfalls konnte in anderen Hauterkrankungen eine Reduktion von CXCR3 im peripherem Blut nachgewiesen werden [99]. Im Vergleich zur Schwere der Psoriasis-Erkrankung findet sich in der Literatur in CD4⁺CXCR3⁺-Zellen keine Korrelation, was auch zu unserem Patientenkollektiv passt [100]. Die Messung von CXCR3 erfolgte in unserem Kollektiv in peripherem Blut und nicht in anderen Kompartimenten wie beispielsweise einer Hautläsion, wo höhere CXCR3 Expressionsmuster in anderen Studien gefunden wurden. Als mögliche Ursache der Reduktion in peripherem Blut im Vergleich zur Haut wird die Rekrutierung der CXCR3⁺-Zellen in die Hautläsionen oder Gelenke diskutiert. So zeigte sich bei PSO in betroffener Haut im Vergleich zu gesunder Haut eine signifikant erhöhte Anzahl an CXCR3⁺-Zellen [101]. Ebenso konnte innerhalb der Synovialflüssigkeit bei PsA (Patient mit Psoriasisarthritis) eine deutliche erhöhte Anzahl festgestellt werden [96]. CXCR3 wird auch von Th1-Zellen exprimiert und wirkt somit möglicherweise über die Rekrutierung dendritischer Zellen und anderer T-Zellen proinflammatorisch [101, 102]. Aufgrund dieser Beobachtungen erfolgte bereits eine Phase II Studie zur Behandlung von Psoriasis mit T487, einem Antikörper gegen CXCR3, welche jedoch nicht fortgeführt wurde [94].

In der Anzahl an CCR7⁺-naiven Zellen konnte sowohl in der Population der CD4⁺- als auch in der CD8⁺-Zellen kein Unterschied festgestellt werden. Erwartungsgemäß konnte bei den T-Effektorzellen kaum eine Expression von CCR7 gezeigt werden. In der Literatur konnten sowohl in PBMCs von PSO als auch in der Haut eine erhöhte Menge an CCR7⁺-Zellen festgestellt werden [103]. Studien wiesen eine Reduktion von CCR7 unter TNF α -Blockade und gleichzeitig auch eine Verringerung des PASI-Wertes nach, sodass eine Erklärung der fehlenden Unterschiede von CCR7 zwischen PSO und HC in unserer Kohorte an der Vortherapie mit dem TNF α -Blocker Adalimumab und grundsätzlich niedrigen PASI-Werten liegen könnte [104] (s. Tabelle 19).

Auch in anderen Autoimmunerkrankungen spielt die Expression von CCR7 und der Liganden CCL21 und CCL19 eine Rolle. So konnte auch bei rheumatoider Arthritis eine Expression von CCR7 und CCL21 in der Synovialflüssigkeit festgestellt werden, welches zu einer Einwanderung von Makrophagen und

T-Zellen in die Gelenke führt und eine Entzündungsreaktion induziert [105]. Innerhalb der Haut bei PSO besteht die Idee, dass zentrale T-Memory-Zellen durch die Expression von CCL19 von dendritischen Zellen in tertiäres Lymphgewebe innerhalb der Haut, sogenannten iSALT („inducible skin-associated lymphoid tissue“) gelockt werden, und dort zu Effektorzellen differenzieren [106].

4.1.2 Unterschiede der Zytotoxizität

Eine Expression von Perforin und GranzymB als Marker der Zytotoxizität konnte innerhalb von TEMRA und Effektor-Zellen sowohl bei CD4⁺-Zellen als auch CD8⁺-Zellen nachgewiesen werden. Innerhalb der CD8⁺-Zellen zeigte sich tendenziell eine erhöhte Expression, was sich auch in der Literatur wiederfindet [92]. Ein signifikanter Unterschied zwischen Perforin⁺ und GranzymB⁺-Zellen bei PSO und HC konnten wir nicht feststellen.

In der Literatur konnte eine erhöhte Expression in peripherem Blut bei CD4⁺CD28⁻-Zellen und in der Haut bei PSO nachgewiesen werden [100]. Auch in gesunder Haut konnte bei PSO eine erhöhte Expression von Perforin und GranzymB nachgewiesen werden [107].

Allerdings ist die Abhängigkeit der Krankheitsaktivität im Form des PASI und der Expression von zytotoxischen Markern beschrieben [108]. Zudem wurde eine geringere Anzahl an GranzymB⁺-Zellen nach medikamentöser Behandlung gezeigt [109]. Hierdurch lässt sich der fehlende Unterschied zwischen PSO und HC in unserem Kollektiv durch die niedrige Krankheitsaktivität (PASI 2,0) und medikamentöse Therapie bei allen PSO erklären (s. Tabelle 19).

Der Einfluss von Perforin und GranzymB auf die Inflammation der Haut ist nicht vollständig geklärt. Manche Arbeitsgruppen postulieren eine mögliche positive Wirkung von zytotoxischen T-Zellen auf die Erkrankung durch die Zerstörung von Keratinozyten [110]. Andere wiederum sehen die Ursache der Proliferation von Keratinozyten in einer Schädigung, aber nicht vollständigen Zerstörung von Keratinozyten, welche anschließend zu einer Hyperplasie von Keratinozyten führt [111].

4.1.3 Unterschied in der Zytokinexpression

In der Expression der verschiedenen proinflammatorischen Zytokine konnten wir in CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sowohl bei IFN γ als auch bei TNF- α und IL-17 keine signifikanten Unterschiede zeigen, auch wenn sich tendenziell eine erhöhte Expression in HC im Vergleich zu PSO zeigte. In der Subgruppe der CCR6⁺ und der CD161⁺-Zellen war die Expression von IFN γ und IL-17 signifikant erhöht in HC. Dies erscheint zunächst im Vergleich zu den in der Literatur existierenden Daten widersprüchlich.

Für IFN γ konnte in der Literatur bei PSO eine erhöhte Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt werden [112]. In der Vergangenheit machte man IFN γ , welches durch Th1-Zellen produziert wird, als Haupttreiber für Psoriasis verantwortlich [64]. Allerdings konnte im weiteren Verlauf die Blockade von IFN γ keinen durchgreifenden Erfolg in der Behandlung von Psoriasis zeigen [113]. Ähnlich führte eine sehr effektive Therapie von Psoriasis mittels IL-23 Blockade nicht zu einer merklichen Reduktion von IFN γ [114]. Eine Korrelation von IFN γ mit der Krankheitsaktivität konnte in manchen Studien gezeigt werden, welches auch eine Erklärung für die Reduktion von IFN γ in unserem Patientenkollektiv mit niedriger Krankheitsaktivität sein kann [112] (s. Tabelle 19).

IFN γ alleinig scheint in der Erkrankung der Psoriasis eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Kombination aus IFN γ und TNF α konnte jedoch als Haupttreiber in der Verbindung von Psoriasis und Atherosklerose identifiziert werden [115].

Für TNF α konnten wir keine Unterschiede zwischen dem Kontroll- und Patientenkollektiv zeigen. In der Literatur konnte eine erhöhte Expression sowohl in der Haut als auch im Blut nachgewiesen werden, welche allerdings ebenfalls wie zuvor mit der Krankheitsaktivität korrelierte [112, 116-119]. Ein Drittel der PSO der PBMC-Charakterisierung erhielt zudem Adalimumab als TNF α -Blocker (s. Tabelle 19). In der Blockade von TNF α konnte eine gute klinische Wirksamkeit nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür scheint jedoch v.a. die Suppression von IL-17 durch die Blockade von TNF α verantwortlich zu sein, da TNF α über

die Freisetzung von IL-23 von Keratinozyten die Stimulation von Th17-Zellen induziert [64, 120, 121].

In unserem Kollektiv zeigte sich überraschenderweise eine erhöhte Expression von IL-17 in gesunden Kontrollen im Vergleich zu unserem Patientenkollektiv. Die Expression von IL-17 zeigt sich in der Literatur im Kollektiv von Patienten mit Psoriasis im Vergleich zu gesunden Kontrollen als ein Haupttreiber von Psoriasis sowohl in der Haut als auch im Blut erhöht [95, 122, 123]. Allerdings war dies wiederum abhängig von der Krankheitsaktivität [124]. Die Hälfte unserer Patienten erhielt zudem entweder eine Therapie mit TNF α -Blockern oder IL-17 Blockade mittels Secukinumab (s. Tabelle 19). In Studien konnte nicht nur eine Reduktion von IL-17, sondern eine niedrigere Expression von IL-17 in Patienten unter Behandlung mit TNF α -Blockern im Vergleich zu gesunden Kontrollen [120]. Dies könnte auch in unserem Kollektiv zutreffen. Der Patient, welcher in unserer Studie mit Secukinumab vorbehandelt war, zeigte allerdings im Vergleich zum Mittelwert keine deutlichen Unterschiede in der Zytokinproduktion im Vergleich zu den anderen Patienten (Daten nicht gezeigt).

4.1.4 Verteilung von Th1/Th17-Zellen

In der Anzahl an Th17-Zellen, definiert über die Expression von CCR6, CD161 und Produktion von IL-17, konnte in der Patientenkohorte und Kontrollgruppe kein Unterschied festgestellt werden. In der Literatur zeigt sich bei PSO sowohl in zirkulierendem Blut als auch in der Haut eine erhöhte Anzahl an Th17-Zellen [95, 125]. Die Induktion von Th17-Zellen erfolgt über die Freisetzung von TNF α , IL-23, IL-6 und TGF- β [30, 126]. In unserer Patientenkohorte waren Patienten sowohl unter Behandlung mit TNF α -Blockern als auch mit Methotrexat (s. Tabelle 19). Studien konnten eine Reduktion von IL-23 und TNF α durch Infliximab, einem TNF α -Blocker, nachweisen [127]. Ebenso konnte eine direkte Reduktion von Th17-Zellen durch Infliximab gezeigt werden [125]. Unter Therapie mit Methotrexat konnte ebenfalls eine Reduktion von IL-23 und TNF- α und Verringerung von Th17-Zellen dargelegt werden [128, 129]. Zudem konnte eine

Korrelation von Th17-Zellen mit dem PASI-Score nachgewiesen werden [130]. Dies könnte eine Erklärung für den fehlenden Unterschied der Anzahl von Th17-Zellen in PSO im Vergleich zu HC sein, da alle PSO eine niedrige Krankheitsaktivität zeigten.

Bei der Anzahl an Th1-Zellen, definiert über die Expression von CXCR3 und Produktion von IFN γ , ergab sich eine signifikant erhöhte Anzahl in HC. Auch in anderen Studien konnte eine verringerte Anzahl an Th1-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden [130]. Eine mögliche Ursache könnte die Wanderung der Th1-Zellen in das entzündliche Gewebe und somit eine Reduktion in peripherem Blut sein. Zudem könnte die Medikation mit Methotrexat und TNF α -Blockade auch hierbei die Ursache für die reduzierte Anzahl an Th1-Zellen in der Patientenkohorte sein [128, 129].

Im Jahr 2007 konnte erstmalig eine weitere Gruppe an Th-Zellen, die Th17/Th1-Zellen, gefunden werden. Diese Zellen weisen sowohl Oberflächenmarker von Th17-Zellen, als auch Th1-Zellen auf. Ebenso produzieren sie sowohl IL-17 als auch IFN γ [131]. Diese Th17/Th1-Zellen mit der Fähigkeit, gleichzeitig IFN γ und IL-17 zu produzieren, werden in der Literatur als pathogener als Th17-Zellen selbst diskutiert [132, 133]. Eine gleichzeitige Expression von IL-17 und IFN γ konnte bei PSO nicht dargestellt werden. Eine Erhöhung von Th17/Th1-Zellen konnte in HC durch die Koexpression von CXCR3 und CCR6 gefunden werden. Ebenso konnte eine erhöhte Expression von IFN γ in CCR6⁺- und CD161⁺-Zellen bei HC gezeigt werden.

4.1.5 Unterschied Anzahl und des Phänotyps der Tregs

In der Anzahl der Tregs in PSO im Vergleich zu HC konnte in unserem Kollektiv kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. In der Literatur finden sich unterschiedliche Aussagen diesbezüglich. In einigen Studien zeigt sich die Anzahl der Tregs bei PSO reduziert [134-136]. Andere wiederum beschreiben sogar eine erhöhte Anzahl an Tregs [137, 138]. Dies legt nahe, dass es weniger auf die absolute Anzahl, als auf den Phänotyp und die Funktion der Tregs ankommt. Die immunsuppressive Funktion der Tregs wird als Hauptregulator

durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 bestimmt [25, 139]. In PSO konnte eine reduzierte Expression von FoxP3 nachgewiesen werden und damit einhergehend auch eine reduzierte immunsuppressive Funktion abgeleitet werden [140].

Eine FoxP3-Expression konnte in unserer Population sowohl in CD4⁺ Zellen als auch in Tregs ohne signifikanten Unterschied zwischen PSO und HC gefunden werden. Auch die Literatur zeigt, dass eine Therapie mit Methotrexat oder TNF- α -Blockern die Expression von FoxP3 normalisieren und ebenfalls die Anzahl an Tregs beeinflussen kann [129, 141, 142]. Gleiches gilt auch für die Expression von IL-10, welche im Vergleich von PSO und HC ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zeigte. In unserer Arbeit wurden die Tregs als CD4⁺CD25⁺CD127⁻-Zellen definiert, während andere Arbeiten unterschiedliche Marker wie beispielsweise CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-Zellen als Definition von Tregs verwendeten [73], sodass die Studien sich nicht 1:1 auf unsere Ergebnisse übertragen lassen. Ebenso wird in unserer Arbeit nicht zwischen den nTregs und iTregs unterschieden. So zeigen nTregs im Vergleich zu iTregs eine deutliche stabilere Expression von FoxP3 [143].

4.1.6 Unterschied in der Treg/Th-17 Plastizität

In unserer Studienpopulation konnte zwischen PSO und HC kein signifikanter Unterschied in der Koexpression von CCR6 und FoxP3 als Hinweis für eine Treg/Th17 Plastizität festgestellt werden. CCR6 zeigt sich auf Th17-Zellen hoch exprimiert [42]. Jedoch findet sich CCR6 auch als Homing-Rezeptor bei gesunden Kontrollen von Tregs auf bis zu 73% [144]. Innerhalb der CD4⁺CCR6⁺-Zellen konnte kein Unterschied in der Expression von anti-inflammatorisch wirkendem IL-10 nachgewiesen werden. Innerhalb der Population der CD4⁺CCR6⁺FoxP3⁺-Zellen konnte tendenziell eine Erhöhung von IL-10 bei HC gezeigt werden, was möglicherweise auf eine geringere Suppression und Funktion der Tregs bei PSO hindeutet. Auch in der Literatur wird bei PSO eine Reduktion von immunsuppressiven Regulatoren der Tregs beschrieben [145]. Infolge wurde bei PSO eine geringere Suppressionsfähigkeit auf T-Effektorzellen nachgewiesen [146].

Die Expression von IL-17 zeigte sich in unserem Kollektiv tendenziell in der Patientenkohorte bei CD4⁺CCR6⁺-, CD4⁺CCR6⁺FoxP3⁺- und CD4⁺CD25⁺CD127⁺FoxP3⁺-T-Zellen erhöht. Dies deckt sich auch mit der Beschreibung von Bovenschen et al., welche eine Differenzierung von Treg-Zellen zu IL-17 produzierenden Tregs mit zunehmendem Verlust von FoxP3 und Expression von ROR γ t beschrieben [51]. So konnten wir in unseren Versuchen, wenn auch nicht statistisch signifikant, T-Zellen mit Koexpression von IL-17 und FoxP3 tendenziell vermehrt in PSO nachweisen, welches die Entstehung von IL-17 produzierenden T-Zellen aus Tregs nahelegt.

Die vermehrte Expression von ROR γ t konnten wir in unserer Patientenkohorte nicht zeigen. In der Literatur konnte jedoch das reziproke Verhältnis von FoxP3 und ROR γ t mehrfach gezeigt werden. So konnten Tregs ex vivo und im Mausmodell unter anderem mit IL-6 und/oder IL-23 stimuliert werden, welches zu einer Reduktion von FoxP3 und einer Erhöhung von ROR γ t führte [147-149]. Gründe für die geringen Unterschiede zwischen PSO und HC in unserer Studienpopulation könnten wiederum in der immunsuppressiven Medikation und deren gutes Ansprechen liegen.

In der Literatur konnte durch TNF α -Blockade bei Patienten, die gut auf die Therapie ansprachen, eine Erhöhung von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-Zellen gezeigt werden. In unserer Kohorte mit zwei PSO unter TNF α -Blockade konnten keine Unterschiede im Vergleich zu HC oder die anderen PSO in Bezug auf die Erhöhung von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-Zellen festgestellt werden. Ebenso konnte eine Reduktion von ROR γ t nachgewiesen werden [148]. Eine Wiederherstellung der Suppressionsfähigkeit der Tregs direkt konnte für die TNF α -Blockade nicht festgestellt werden, hingegen für die Blockade mit anti-IL-17 und anti-IL-23 Antikörpern [150].

4.2 Charakterisierung der Tregs unter verschiedenen Stimulationen

4.2.1 Einfluss der Stimulation auf die Oberflächenmarker

Nach Stimulation der isolierten Tregs zeigte sich die Expression von CCR6 in PSO im Vergleich zur HC unabhängig von der Stimulation leicht erhöht. Dies konnte in ähnlicher Form sowohl in CD4⁺-Zellen als auch in den Subgruppen innerhalb der CD4⁺FoxP3⁻, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ und CD4⁺CD25⁺⁺CD127⁻FoxP3⁺-Zellen gezeigt werden. In der Charakterisierung der PBMCs ohne Kultivierung konnte kein Unterschied in der Expression von CCR6 gezeigt werden (s. Kapitel 4.1.1).

Bereits in der Kultivierung der Zellen ohne Stimulation konnte dieser Unterschied festgestellt werden. Dies könnte dafür sprechen, dass Tregs in Patienten ex vivo ohne Medikation ein erhöhtes Potential zeigen, CCR6 als Th17-Marker zu exprimieren.

Interessanterweise zeigte sich unter Stimulation mit IL-6 und IL-23 in unserem Versuch eine geringere Expression von CCR6⁺ sowohl in PSO als auch HC, wobei bei PSO eine erhöhte Expression aufgrund der möglichen Plastizität zu Th17-ähnlichen-Tregs zu erwarten gewesen wäre [51, 147, 149].

Bei CD4⁺CD25⁺CD127⁻-Zellen von PSO war dieser Unterschied nach Stimulation mit dem Th17-induzierenden Cocktail im Vergleich zu unstimulierten Zellen sogar signifikant niedriger. Auch unter Secukinumab zeigte sich eine leichte Reduktion von CCR6, welche insbesondere in CD4⁺CD25⁺CD127⁻-Zellen von Patienten nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine Stabilisierung der Tregs hindeuten, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist. Studien konnten eine Reduktion von Th1-Zellen und Th17-Zellen sowie CXCR3 und CCR6 nach dreimonatiger Therapie mit Secukinumab bei PSO nachweisen [150, 151]. Diese Reduktion von CCR6⁺ konnte durch unseren anti-IL17A-Antikörper im Labor nicht gezeigt werden, wobei zu beachten ist, dass man den Laborantikörper nicht auf die Ergebnisse mit Secukinumab übertragen kann, da eine funktionelle Inhibition für diesen nicht nachgewiesen ist.

In der Expression von FoxP3 konnte im Vergleich zur Stimulation mit antiCD3/CD28 und ohne Stimulation eine Erhöhung sowohl in CD4⁺- als auch in CD4⁺CD25⁺CD127⁻-Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte durch eine transiente Erhöhung von FoxP3 bei Stimulation mit antiCD3/CD28 ohne gleichzeitige verbesserte Suppressionsfunktion, wie sie bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde, erklärt werden [152, 153].

Tendenziell zeigte sich eine höhere Expression von FoxP3 bei PSO in der Positiv- und Negativkontrolle.

Unter Stimulation mit dem Th17-induzierenden Cocktail zeigte sich innerhalb der CD4⁺-Zellen tendenziell eine geringere Expression von FoxP3 bei PSO im Vergleich zu den HC, was auf eine mögliche Destabilisierung der Suppressionsfunktion der Tregs hindeuten könnte. Innerhalb der Subpopulation der CD4⁺CD25⁺CD127⁻-Zellen konnte dieser Unterschied jedoch nicht mehr gezeigt werden, was auf eine verminderte Reinheit der Tregs nach MACS-Separation zurückzuführen sein könnte (s. Tabelle 33).

Eine weitere Erklärung für die hohe Expression von FoxP3 unter Stimulation mit dem Th17-induzierenden Cocktail könnte in der geringen Zeitdauer der Stimulation liegen. Bereits in anderen Arbeiten wurde die Plastizität von Tregs zu Th17-Zellen über ein Zwischenstadium mit Doppelexpression von FoxP3 und IL-17 beschrieben [51, 154]. Koenen et al konnten dabei feststellen, dass an Tag 5 sowohl FoxP3 als auch IL-17 exprimiert wurden, wohingegen an Tag 8 FoxP3 bereits deutlich reduziert war [147]. Wir verwendeten für unsere Stimulation 6 Tage, sodass die Dauer eine Ursache für die erhöhte Expression von FoxP3 sein könnte. Im Vergleich verwendeten andere Studien für die Dauer der Stimulation jedoch auch eine Zeit zwischen 3 und 5 Tagen [51, 87, 155, 156]. Marek et al konnten in ihrer Studie feststellen, dass Tregs einen zunehmenden Verlust von FoxP3 und ihrer suppressiven Funktion lediglich durch die Dauer der Kultivierung zeigten. Dies beginnt bereits ab einer Woche nach Kultivierung, wohingegen der Effekt insbesondere bei Kultivierung über 2 Wochen relevant wird [157].

Auch unter der Stimulation mit anti-IL17A-Antikörpern aus dem Labor konnte eine deutliche Verringerung von FoxP3⁺-Zellen bei PSO, ebenso bei Secukinumab innerhalb der CD4⁺-Zellen festgestellt werden.

4.2.2 Einfluss der Stimulation auf die Zytokine

In der Expression von IL-17 konnte erwartungsgemäß in den Zellen ohne Stimulation sowohl bei HC als auch bei PSO die niedrigste Expression gezeigt werden.

Im Vergleich von PSO zu HC konnte in der Patientenkohorte auch bei unstimulierten Zellen nach der Kultivierung eine erhöhte Expression von IL-17 nachgewiesen werden, wohingegen sich bei der PBMC-Charakterisierung noch eine erhöhte Anzahl von IL-17⁺-Zellen bei HC zeigte. Dies spricht für das Potential von Tregs, sich bei PSO ohne protektive medikamentöse Therapie zu Th17-Zellen zu verschieben. In unserer Kohorte waren 75% unter Medikation (TNF α -Blocker, IL-12/IL-23-Antikörper oder IL-17-Antikörpern) (Vgl. Tabelle 27). Die Herunterregulation von IL-17 durch die Medikation, welche in unserer Studienpopulation eingenommen wurde, wurde bereits in Kapitel 4.1.3 beschrieben.

Unter der Stimulation mit dem Th17-induzierenden Cocktail zeigte sich bei PSO in den CD4⁺-Zellen im Vergleich zu HC überraschenderweise keine erhöhte Expression von IL-17, wie sie in anderen Studien beschrieben wurde [51, 147]. Innerhalb der HC konnten wiederum die höchsten IL-17-Werte unter proinflammatorischem Milieu mit dem Th17-induzierenden Cocktail nachgewiesen werden. Dies könnte an dem noch persistierenden Einfluss der Medikation innerhalb der PSO liegen, welche die Tregs auch unter proinflammatorischem Milieu stabilisiert.

Unter Betrachtung der Subpopulationen zeigten sich unter Stimulation mit dem Th17-induzierenden Cocktail bei CD4⁺CCR6⁺-Zellen und CD4⁺D25⁺CD127⁻-Zellen erhöhte Expressionen von IL-17 bei PSO im Vergleich zu HC, hingegen bei CD4⁺FoxP3⁺- und insbesondere CD4⁺CD25⁺CD127⁻FoxP3⁺-Zellen erniedrigte Werte. Diese Beobachtung spricht für eine erhöhte IL-17-Produktion von Th17-Zellen und nicht von Tregs

oder Th17-ähnliche-Tregs. Ursache dafür könnte eine Verunreinigung mit Th17-Zellen nach der Separation sein (s. Tabelle 33). Allerdings könnte auch eine Verschiebung von Tregs hin zu Th17-Zellen, welche in PSO leichter und schneller vonstatten geht, verantwortlich sein.

In der Positivkontrolle und den anderen Stimulationen konnte die Reduktion von IL-17 innerhalb der CD4⁺FoxP3⁻ und CD4⁺CD25⁺⁺CD127⁻FoxP3⁻-Zellen bei PSO im Vergleich zu HC nicht nachgewiesen werden. Dies könnte daran liegen, dass Tregs von PSO eine erhöhte Expression von IL-17 zeigen, jedoch nur unter dem Th17-induzierenden Cocktail ein Verlust von FoxP3 und eine Verschiebung zu Th17-Zellen stattfindet.

Auch in der Expression von IFN γ konnte bei unstimulierten Zellen nach Kultivierung die niedrigste Expression gezeigt werden. Unabhängig von der Stimulation konnte bei PSO im Vergleich zu HC eine erhöhte Expression von IFN γ nachgewiesen werden. Vor Kultivierung zeigt sich noch eine geringere Expression von IFN γ bei PSO. Auch dabei könnte die Ursache in der fehlenden protektiven Medikation in der Kultur liegen.

Das mögliche Vorhandensein von Th1-ähnlichen-Tregs, wie sie bei PSO beschrieben sind, könnte durch eine Stimulation mit antiCD3/CD28 zu einer Produktion von IFN γ führen [46, 125]. Dies könnte auch die erhöhte Expression von IFN γ in der Subpopulation der FoxP3⁺ erklären. Ebenfalls könnte eine Verunreinigung mit aktivierten CD25⁺ Th1-Zellen nach der Separation eine Erklärung liefern. Leider konnte dies nicht weiter differenziert werden, da die Marker für Th1-Zellen aufgrund der geringen Gesamtzellzahl nicht bestimmt wurden.

Die deutlich erhöhte Expression von IFN γ in PSO im Vergleich zu HC innerhalb von CD4⁺CCR6⁺-Zellen könnte das Vorhandensein von Th1/Th17-Zellen nachweisen, wie sie bereits in Kapitel 4.1.4 näher beschrieben wurden. Vor Kultivierung konnten diese Zellen in der PBMC-Charakterisierung bei PSO nicht nachgewiesen werden. Nach Kultivierung konnte nun eine Koexpression von IL-17 und IFN γ innerhalb PSO aber nicht HC nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Stimulationen zeigte sich dabei nicht. Der Unterschied konnte sowohl in CD4⁺-Zellen als auch in den Subpopulationen

der CD4⁺CCR6⁺- und CD4⁺FoxP3⁺-Zellen nachgewiesen werden. Ursächlich dafür könnte eine Verschiebung von Tregs nach Stimulation mit antiCD3/CD28 hin zu Th1/Th17-Zellen sein, da die Koexpression auch in CD4⁺FoxP3⁺-Zellen nachgewiesen werden konnte. Alternativ könnte auch eine Verunreinigung der Kulturen mit Th1/Th17-Zellen nach Separation eine Erklärung liefern.

4.3 Einfluss der Stimulationen auf die Suppressionsfähigkeit der Tregs

4.3.1 Suppressionsversuch

Nach der Charakterisierung der Tregs erfolgte die Analyse der Funktion durch Suppressionsversuche mittels verschiedener Stimulationen bei HC und PSO.

In der Proliferation von PBMCs ohne Tregs bei PSO und HC konnte hierbei unabhängig von der Stimulation kein Unterschied gezeigt werden. Lediglich im Th17-induzierenden Ansatz konnte eine geringgradig verringerte Proliferation der PBMCs sowohl bei HC als auch PSO gezeigt werden. Dies könnte an der antisuppressiven Wirkung von TGF- β innerhalb des Th17-induzierenden Cocktails liegen.

Im Vergleich der Proliferation zwischen PSO und HC konnte in allen Stimulationen bis auf Th17 eine leicht erhöhte Proliferation von PBMCs nachgewiesen werden. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der leichteren Stimulierbarkeit der PBMCs von PSO als Ausdruck der Autoimmunkrankheit.

Die Inhibition errechnet über die Proliferation der Effektorzellen in Anwesenheit von Tregs und Kultivierung in verschiedenen Stimulationen zeigte keine relevanten Unterschiede zwischen PSO und HC. Eine mögliche Erklärung liegt in der medikamentösen Therapie mit Fumarsäure, Methotrexat und Biologika sowie der niedrigen Krankheitsaktivität innerhalb der PSO (Vgl. Tabelle 32). Eine gute supprimierende Funktion von Tregs konnte unter Remission der Psoriasis Erkrankung auch in anderen Studien nachgewiesen werden [158].

In den Kulturen mit dem Laborantikörper anti-IL17A und Secukinumab konnte im Vergleich zur Positivkontrolle kein signifikanter Unterschied bzgl. der Inhibition gezeigt werden. Dies könnte daran liegen, dass innerhalb der Effektorzellen keine deutlich erhöhte Expression von IL-17 oder Th17-Zellen bei PSO oder HC vorliegt (s. PBMC-Charakterisierung, Kapitel 3.1.3 und 3.1.5). Des Weiteren scheint die Hauptwirkweise der IL-17-Blockade in der Therapie der Psoriasis auf die Hemmung der Keratinozyten und damit Besserung der Symptome zu liegen [159]. Eine Hemmung der plastischen Entwicklung von Tregs zu Th17-Zellen

durch die Blockade von IL-17 konnte bisher nicht gezeigt werden. Allerdings konnten Studien einen IL-17-Rezeptor auf CD4⁺-T-Zellen, Tregs und Th17-Zellen nachweisen [160]. Durch diesen Rezeptor könnte IL-17 selbst über eine negative Feedbackschleife einen Kontrollmechanismus für Th17-Zellen darstellen [161]. Unter Kultivierung mit IL-17 zeigten sich keine Unterschiede in der Proliferation oder Inhibition im Vergleich zu der Positivkontrolle in unserem Suppressionsversuch. Crawford et al. konnten in einem Suppressionsversuch in der Proliferation ebenfalls keine Unterschiede zeigen, jedoch eine geringere Inhibition von CD4⁺-Zellen unter Kultivierung mit suppressiven CD8⁺-Zellen. Dieser Unterschied war unter Kultivierung mit IL-17A nur gering, jedoch deutlich stärker ausgeprägt unter Co-Kultivierung mit IL-17A und IL-17F. Ursächlich wird hierfür die direkte Auswirkung von IL-17 auf CD4⁺-Zellen in Form einer Resistenz gegenüber der Suppression gemacht [162]. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir bei Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) eine Normalisierung der FoxP3-Expression und der suppressiven Funktion von Tregs unter Stimulation mit Secukinumab im Vergleich zu HC nachweisen [163].

In der Kultur mit dem Th17-induzierenden Cocktails konnte eine deutlich geringere Inhibition der PBMC sowohl bei PSO als auch bei HC gezeigt werden. Die Ursache hierfür konnte entweder in der Dysfunktion der Tregs oder die Resistenz der PBMCs gegenüber der Suppression durch die Tregs liegen.

Wie in Kapitel 1.1.6.2 beschrieben zeigen Tregs unter Stimulation mit IL-6, TGF- β und IL-23 einen Verlust von FoxP3 und bei längerer Stimulation auch einen Verlust der suppressiven Funktion. In der Treg-Charakterisierung nach Stimulation im Th17-Milieu konnte in unserem Versuch keine klare Erniedrigung von FoxP3 gezeigt werden, was allerdings auch an der transienten Erhöhung von FoxP3 durch die Zellaktivierung liegen könnte [4].

Auch die IL-17 Expression zeigte sich unter Th17-Milieu im Vergleich zu den anderen Stimulationen sowohl bei PSO als auch bei HC nicht signifikant erhöht. In der Treg-Charakterisierung erfolgte nicht die Messung von IL-10, welches als anti-inflammatorisches Zytokin zur weiteren Beurteilung der Tregs weitere Informationen hätte liefern können, da die Gesamtzahl an Tregs nach Isolation für weitere Messungen zu gering war. Da sich die Treg-Dysfunktionalität in der

Treg-Charakterisierung nicht klar darstellt, rückt der Erklärungsansatz der Resistenz von PBMCs gegenüber der Suppression von Tregs in den Vordergrund.

In unserer Arbeitsgruppe konnten bei Patienten mit Sklerodermie unterschiedliche Suppressionen in Abhängigkeit CD4⁺ naiver und Memory-T-Zellen mit und ohne Expression von CCR7 gezeigt werden [164]. In anderen Autoimmunkrankheiten konnte eine Resistenz von Effektorzellen gegenüber Tregs bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I und Multipler Sklerose nachgewiesen werden [165, 166]. Insbesondere bei Th17-Zellen konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber der Suppression nachgewiesen werden, was eine weitere Ursache der Inflammation bei Patienten mit Psoriasis aufgrund der erhöhten Th17-Zellen sein kann [162]. Auch bei JIA konnte in unserer Arbeitsgruppe unter Th17-induzierendem Cocktail eine erhöhte FoxP3-Expression, jedoch eine erniedrigte Inhibition der PBMCs festgestellt werden, sodass auch in dieser Studie die Ursache eine mögliche Effektorresistenz sein könnte [163].

Bei Patienten mit Multipler Sklerose konnte neben der erhöhten Resistenz von Effektorzellen gegenüber Tregs im Vergleich HC auch eine erhöhte extrazelluläre GranzymB-Konzentration gemessen werden. Die Stimulation von extrazellulärem GranzymB erfolgt unter anderem über IL-6, welches auch in unserem Th17-induzierenden Cocktail vorhanden ist und hierbei auch möglicherweise ursächlich für die Resistenz von PBMCs ist [167].

In einer weiteren Studie zur Effektorresistenz konnte bei Patienten mit Multipler Sklerose wiederum IL-6 als mögliche Ursache verantwortlich gemacht werden. Hierbei zeigte sich bei Effektorzellen von Patienten mit Multipler Sklerose eine Überexpression des IL-6 α -Rezeptors und hierüber eine Aktivierung von STAT3 durch Phosphorylierung, welche zu einer Resistenz gegenüber Tregs führt. Durch den Block von pSTAT3 konnte diese Resistenz vermindert werden [168]. Interessanterweise spielen IL-6 und STAT3 wie bereits in Kapitel 1.1.4 beschrieben auch eine essenzielle Rolle in der Entwicklung von Th17-Zellen aus naiven T-Zellen und in der Treg/Th17-Plastizität.

Wahrscheinlich spielen sowohl die Dysregulation der Tregs als auch die Resistenz der PBMCs in Kombination eine Rolle in der verminderten Inhibition der PBMCs unter Kultivierung im Th17-Milieu und sind auch nicht vollständig zu trennen.

4.3.2 Tregs und Secukinumab koadministriert

In den zuvor beschriebenen Suppressionsversuchen konnte innerhalb der Kultur mit Secukinumab oder dem Laborantikörper anti-IL-17 kein Unterschied in der Proliferation oder Inhibition im Vergleich zur Positivkontrolle gezeigt werden. Eine Vermutung hierfür lag im fehlenden Vorhandensein von IL-17, welches geblockt werden könnte, und damit einen Einfluss auf die Inhibition haben könnte.

Daher erfolgte die Wiederholung des Suppressionsversuches mit einem Th17-induzierenden Cocktail in An- oder Abwesenheit von Secukinumab.

Hierbei konnte wie bereits in vorherigem Versuch gezeigt unter der Kultivierung mit dem Th17-induzierenden Cocktail eine signifikant geringere Inhibition von PBMCs gezeigt werden. Unter der Zugabe von Secukinumab gemeinsam mit dem Th17-induzierenden Cocktail konnte weiterhin eine reduzierte Inhibition der PBMCs nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die alleinige Produktion von IL-17 durch die Stimulation der PBMCs mit dem Th17-induzierenden Cocktail nicht für reduzierte Inhibition von PBMCs verantwortlich zu sein scheint.

Eine Erklärung würde, wie bereits im vorherigen Kapitel diskutiert, die Plastizität der Tregs zu dysfunktionalen Tregs durch den Th17-induzierenden Cocktail direkt unabhängig von IL-17 liefern.

Alternativ könnte auch die Resistenz der PBMCs gegenüber der Suppression durch Tregs eine mögliche Erklärung sein. IL-17 scheint jedoch in unserem Versuch weniger relevant für die Resistenz der PBMCs, wie es in anderen Studien postuliert wird [162].

Es erfolgte nicht die Messung von IL-17 oder Th17-Zellen nach Stimulation mit dem Th17-induzierenden Cocktail, sodass die fehlende Wirkung von Secukinumab möglicherweise auch durch eine fehlende Stimulation der PBMCs durch den Th17-induzierenden Cocktail zu erklären sein kann.

4.3.3 Suppressionsfähigkeit von Tregs nach vorheriger Kultivierung

Zur Differenzierung, ob die geringere Inhibition der PBMCs unter dem Th17-Milieu eine Ursache der dysfunktionalen Tregs oder der Resistenz der PBMCs gegenüber den Tregs ist, erfolgte ein weiterer Suppressionsversuch. Hierfür wurden die isolierten Tregs im IL-2 und Th17-Milieu kultiviert und anschließend ein Suppressionsversuch mit antiCD3/CD28 oder Secukinumab durchgeführt.

Hierbei zeigte sich eine nahezu vollständig fehlende Inhibition unter der Kultivierung mit Tregs, welche zuvor in Th17-Milieu kultiviert wurden. Dies war unabhängig von der Suppression unter Zugabe von Secukinumab. Innerhalb der Tregs, welche zuvor in IL-2 kultiviert wurden, zeigte sich eine deutlich größere Inhibition, ebenfalls unabhängig von der Zugabe von Secukinumab. Im ersten Moment würde dies auf eine Dysregulation der Tregs durch den Th17-induzierenden Cocktail schließen. Bei Betrachtung der Anzahl von Tregs im Suppressionsversuch zeigt sich jedoch bei den Tregs nach Stimulation im Th17-Milieu eine deutlich geringere Anzahl an Tregs im Vergleich zu PBMCs. Ursächlich hierfür scheint eine Apoptose von Tregs unter Th17-Milieu oder eine Proliferation von Tregs unter IL-2 Bedingungen zu sein.

4.4 Technische Limitationen

4.4.1 Limitationen innerhalb der Kohorten

Die Anzahl der Patienten und Kontrollen betrug in unserer Kohorte 10 bzw. 12, sodass die Anzahl eher gering, dennoch repräsentativ ist.

Innerhalb der Patientenkohorte zeigte sich insgesamt eine deutliche Vorbehandlung mit verschiedenen Medikationen und dadurch auch insgesamt geringere PASI-Werte als Zeichen der Krankheitsaktivität. Durch die Medikation zeigte sich daher bereits eine Beeinflussung unserer Ergebnisse, welche jedoch in die Interpretation der Ergebnisse miteingeflossen ist [149].

Das Alter der Patientenkohorte war zudem deutlich höher als in der vergleichenden Probandengruppe. Auch dies muss in den Ergebnissen berücksichtigt werden, da in unterschiedlichem Alter auch unterschiedliche Reifegrade des Immunsystems berichtet werden. So zeigt sich beispielsweise eine Verschiebung von naiven T-Zellen zu Memory-Zellen in Abhängigkeit des Alters [89]. Ein Einfluss des Alters auf die anderen Ergebnisse kann somit nicht ausgeschlossen werden.

4.4.2 Methodenabhängige Limitationen

Aufgrund der limitierten Zahl an Zellen von PSO waren teilweise nur niedrige Zellzahlen für die Suppressionsversuche verwendet worden, was einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben könnte. Dies gilt ebenfalls für die Treg-Charakterisierung, für die ebenfalls aufgrund der zahlreichen unterschiedlichen Ansätze teilweise nur eine geringe Anzahl an Tregs verwendet werden konnte.

Der Vergleich der Treg-Charakterisierung mit den Suppressionsversuchen lässt sich nur bedingt führen, da aufgrund der geringen Zellzahl nicht dieselben Tregs charakterisiert wurden, welche auch anschließend im Suppressionsversuch verwendet wurden. Dies wurde jedoch auch in der statistischen Auswertung berücksichtigt.

Die Dosierung der unterschiedlichen Zytokine innerhalb der Suppressionsversuche und der Treg-Charakterisierung wurde durch uns anhand von Vorversuchen in unserer Arbeitsgruppe und Literaturrecherche festgelegt. Ob ein Unterschied in der Dosierung beispielsweise bei IL-17 einen größeren Einfluss auf die Treg oder PBMCs gezeigt hätte, kann nicht ausgeschlossen werden.

In der Durchflusszytometrie wurden vor allem in der Messung der Zytokine teilweise sehr geringe Werte in den Subpopulationen gemessen, sodass hierbei das Gating der Fluoreszenz-Ereignisse (Events) mit Unschärfen behaftet sein kann.

Weiterhin sind im Vergleich mit anderen Studien die Subpopulationen häufig durch unterschiedliche Zellmarker definiert, welches in der Interpretation und im Vergleich mit anderen Studien berücksichtigt werden muss. Einheitliche Marker für Tregs existieren nicht, es wurden allerdings in dieser Arbeit die gebräuchlichsten und anerkannten Marker wie CD25, CD127 und FoxP3 verwendet.

4.5 Konklusion

In unserer Arbeit konnten in der PBMC-Charakterisierung zwischen PSO und HC Unterschiede festgestellt werden.

So zeigten sich in der PBMC-Charakterisierung bei PSO eine erhöhte Anzahl an Effektorzellen und eine reduzierte Anzahl an naiven T-Zellen als mögliches Zeichen einer erhöhten Antigen-Stimulation unter inflammatorischen Bedingungen.

Innerhalb der Chemokinrezeptoren konnte jedoch keine erhöhte Anzahl an proinflammatorischen Markern wie CCR6 festgestellt werden. Ebenso zeigte sich in der Zytokinproduktion kein signifikanter Unterschied.

Bei der Produktion von IL-17 konnte in Subpopulationen sogar eine erhöhte Produktion bei HC im Vergleich zu PSO gezeigt werden. Ursächlich hierfür scheinen die niedrige Krankheitsaktivität und die bereits fortgeschrittene laufende Therapie der Patienten zu sein.

Passend dazu fanden sich auch Th1-, Th17-Zellen und Tregs, welche ein Haupttreiber für die Pathogenese der Psoriasis sind, bei PSO nicht erhöht. Bei Tregs fanden sich sowohl in der Anzahl als auch in der Expression von FoxP3 keine relevanten Unterschiede.

Als Zeichen einer Treg/Th17-Plastizität konnte innerhalb der CCR6⁺-Subpopulationen eine Erhöhung von IL-17 gezeigt werden, auch wenn diese nicht signifikant war.

In der folgenden Charakterisierung nach Isolierung der Tregs und Kultur unter verschiedenen Stimulationen konnten wir anschließend die Veränderungen der Tregs bei PSO und HC analysieren. Nach Kultivierung der Zellen unter unspezifischer T-Zell-Rezeptor-Stimulation mit antiCD3/CD28 konnte bereits eine erhöhte Expression von CCR6⁺ als Th17-Marker bei PSO gefunden werden. Dies zeigte sich auch in der tendenziell erhöhten Produktion von IL-17 in der Patientenkohorte nach Kultur.

Des Weiteren findet sich eine höhere Expression von IFN γ in der Patientenkohorte im Vergleich zu HC. Dies spricht vermutlich für eine erhöhte

Neigung der T-Zellen bei PSO zu einem autoinflammatorischen Geschehen. Ein direkter Einfluss von IL-17 auf die Tregs konnte in der Treg-Charakterisierung nicht festgestellt werden.

Die Untersuchung der Funktion der Tregs mittels Suppressionsversuch unter den verschiedenen Stimulationen zeigte keinen relevanten Unterschied zwischen PSO und HC. Eine Verschlechterung der inhibitorischen Funktion der Tregs konnte in beiden Kohorten unter Th17-Milieu nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit für die geringere Inhibition könnte die direkte Wirkung von inflammatorischen Zytokinen auf Tregs sein, die zweite Möglichkeit der Einfluss auf die Effektorzellen. Das Th17-Milieu könnte zu einer Effektorresistenz gegenüber Tregs führen.

IL-17 hatte auf die Funktion der Tregs in unserem Experiment keinen Einfluss. Eine mögliche Erklärung ist eine zu geringe Dosierung von IL-17A. Eine Kostimulation mit IL-17A und IL-17F könnte ebenfalls einen Effekt zeigen.

In einem weiterführenden Versuch konnte im Suppressionsversuch unter Kostimulation im Th17-Milieu und Secukinumab keine Verbesserung der Inhibition festgestellt werden. IL-17 allein scheint demnach nicht für eine erhöhte Proliferation von Effektorzellen in Kultur mit Tregs verantwortlich zu sein.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse einen weiteren Einblick in die Zellplastizität bei Autoimmunerkrankungen mit Augenmerk auf die Th17/Treg-Plastizität und PSO, um in Zukunft die Pathomechanismen besser zu verstehen und damit neue Therapieansätze und Medikamente zu entwickeln. Damit könnten Patienten mit chronischen Erkrankungen möglicherweise eine effektive, zielgenaue und nebenwirkungsarme Therapie angeboten werden und in Zukunft chronisch verlaufende Erkrankungen geheilt werden.

4.6 Ausblick

In unserer Arbeit erfolgte die Analyse der Oberflächenmarker der PBMC-Charakterisierung mittels durchflusszytometrischer Messungen nach intra- und extrazellulärer Markierung. Gleichzeitig wäre die Untersuchung auf Genom- und Transkriptomebene mittels PCR oder Single-cell-Sequenzierung zur Bestätigung unserer Messungen interessant.

Aufgrund der geringen Anzahl insbesondere an Tregs nach der Isolation konnten wir die verschiedenen Experimente nur unverbunden durchführen. Interessant wären die Ergebnisse mit verbundenen Proben.

In unserer Patientenkohorte waren die Patienten bereits unter verschiedenen Therapielinien in Behandlung. Zudem zeigte sich unter dieser Therapie bei den Patienten eine nur moderate Krankheitsaktivität. Für zukünftige Versuche wäre eine Analyse von therapienaiven Patienten mit hoher Krankheitsaktivität und denselben Patienten nach Beginn einer Therapie sehr interessant.

Die Untersuchung der Zellen erfolgte in unseren Experimenten in peripherem Blut. Für zukünftige Analysen wäre ein Versuchsaufbau mit Zellen der betroffenen und gesunden Haut bei PSO sicherlich ein interessanter Ansatz, da sich auch in anderen Studien deutliche Unterschiede im Vergleich der Kompartimente zeigten. Hierdurch wäre eine verbesserte Aussagekraft bezüglich der Auswirkung im entzündeten Gebiet möglich.

Epigenetische Untersuchungen an den regulatorischen Genregionen von FOXP3 wurden in unserer Studie bisher nicht durchgeführt. Durch PCR und DNA-Methylierungsanalysen könnten weitere Erkenntnisse zur Methylierung der Genregionen von FOXP3 und ROR γ t gewonnen werden und damit die durchflusszytometrischen Daten unterstützen.

5 Zusammenfassung

In der Pathogenese der Psoriasis spielen IL-17, welches hauptsächlich durch Th17-Zellen gebildet wird, und die Plastizität von Tregs zu Th17-Zellen mit Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie die möglicherweise reduzierte suppressive Funktion von Tregs eine entscheidende Rolle. Wir versuchten daher in unserer Arbeit einen Überblick über die T-Zellverteilung im peripherem Blut bei PSO und HC zu erhalten und die Reaktion der Zellen auf IL-17, anti-IL-17 und Secukinumab sowie ein Th-17 induzierendes Milieu im Vergleich von PSO und HC zu evaluieren.

In der durchflusszytometrischen Messung der PBMCs von PSO und HC konnten bei PSO tendenziell weniger inflammatorische Marker, wahrscheinlich aufgrund der niedrigen Krankheitsaktivität und der bereits eingeleiteten medikamentösen Therapie mit u.a. Antikörpern bei Studieneinschluss festgestellt werden.

Nach Isolierung der Tregs und Kultivierung konnten bei PSO im Vergleich zu HC erhöhte proinflammatorische Marker wie CCR6, IL-17 und IFN γ nachgewiesen werden. Dies kann an der höheren Plastizität von Tregs bei PSO ex vivo ohne den Einfluss einer medikamentösen Therapie hin zu inflammatorischen Zellen wie Th1- und Th17-Zellen, welche IFN γ und IL-17 produzieren, liegen.

In den Suppressionsversuchen zeigte sich sowohl bei PSO als auch bei HC unter Th17-induzierendem Milieu eine verminderte Inhibition der PBMCs durch die autologen Tregs. Ursächlich hierfür könnte eine Dysregulation der Tregs durch das Th17-Milieu oder eine Auswirkung des Th17-induzierenden Cocktails auf die PBMCs im Sinne einer Effektorresistenz gegenüber den Tregs sein. Dies kann in der Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Eine Veränderung der Suppression ergab sich für IL-17 oder anti-IL-17 im Vergleich zur Positivkontrolle nicht. Unter der gleichzeitigen Kultivierung mit Secukinumab und einem Th17-induzierendem Cocktail konnte keine verbesserte Inhibition festgestellt werden, sodass Secukinumab hier scheinbar keinen Einfluss auf die Effektorresistenz oder Treg-Plastizität hatte.

Insgesamt bestätigt die Arbeit eine Instabilität der Tregs bei PSO mit der Möglichkeit der Plastizität zu Th17-Zellen unter proinflammatorischem Milieu, sowie einen Verlust der Suppressionsfähigkeit durch eine Treg-Dysfunktion oder eine erhöhte Effektorresistenz. Für IL-17 oder die Blockade von IL-17 durch monoklonale Antikörper konnte in unserer Studie kein Einfluss festgestellt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Kenneth Murphy, C.W., *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum, Berlin, 2018.
2. Barbara Bröker, C.S., Bernhard Fleischer, *Grundwissen Immunologie*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 2019.
3. Abbas, A., A. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. 2017, Philadelphia, UNITED STATES: Elsevier.
4. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 531-64.
5. Tian, Y., et al., *Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA*. *Nature Communications*, 2017. **8**(1): p. 1473.
6. Hintzen, R.Q., et al., *Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes*. *J Immunol*, 1993. **151**(5): p. 2426-35.
7. Benichou, G., et al., *Role of Memory T Cells in Allograft Rejection and Tolerance*. *Frontiers in Immunology*, 2017. **8**.
8. Peiser, M., *Role of Th17 Cells in Skin Inflammation of Allergic Contact Dermatitis*. *Clinical & developmental immunology*, 2013. **2013**: p. 261037.
9. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. *Immunology*, 1970. **18**(5): p. 723-37.
10. Sakaguchi, S., et al., *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*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
11. Suri-Payer, E., et al., *CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells*. *J Immunol*, 1998. **160**(3): p. 1212-8.
12. Caramalho, Í., et al., *Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus*. *Frontiers in Immunology*, 2015. **6**.
13. Caramalho, I., et al., *Human regulatory T-cell development is dictated by Interleukin-2 and -15 expressed in a non-overlapping pattern in the thymus*. *J Autoimmun*, 2015. **56**: p. 98-110.
14. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. *J Exp Med*, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
15. Bakdash, G., et al., *Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells*. *Mucosal Immunology*, 2015. **8**(2): p. 265-278.
16. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor?* *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 626-635.
17. Kanamori, M., et al., *Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications*. *Trends Immunol*, 2016. **37**(11): p. 803-811.
18. Chen, Q., et al., *IL-2 Controls the Stability of Foxp3 Expression in TGF-beta-Induced Foxp3+ T Cells In Vivo*. *The Journal of Immunology*, 2011. **186**(11): p. 6329.
19. Kühn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. *Cell*, 1993. **75**(2): p. 263-74.
20. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. *Nature*, 2007. **450**(7169): p. 566-569.
21. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 523-32.
22. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. *Blood*, 2004. **104**(9): p. 2840-8.
23. Xu, Z., et al., *The Dynamic Role of FOXP3+ Tregs and Their Potential Therapeutic Applications During SARS-CoV-2 Infection*. *Frontiers in Immunology*, 2022. **13**.
24. Bacchetta, R., F. Barzagli, and M.-G. Roncarolo, *From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2018. **1417**(1): p. 5-22.

25. Huehn, J. and M. Beyer, *Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells*. *Semin Immunol*, 2015. **27**(1): p. 10-8.
26. Bai, L., et al., *DNA Methylation in Regulatory T Cell Differentiation and Function: Challenges and Opportunities*. *Biomolecules*, 2022. **12**(9): p. 1282.
27. Shu, Y., et al., *Epigenetic Variability of CD4+CD25+ Tregs Contributes to the Pathogenesis of Autoimmune Diseases*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2017. **52**(2): p. 260-272.
28. Ono, M., et al., *Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1*. *Nature*, 2007. **446**(7136): p. 685-689.
29. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function*. *Nature*, 2008. **453**(7192): p. 236-40.
30. Dienz, O. and M. Rincon, *The effects of IL-6 on CD4 T cell responses*. *Clin Immunol*, 2009. **130**(1): p. 27-33.
31. Santarasci, V., et al., *TGF-β indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells*. *European Journal of Immunology*, 2009. **39**(1): p. 207-215.
32. Louten, J., K. Boniface, and R. de Waal Malefyt, *Development and function of TH17 cells in health and disease*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2009. **123**(5): p. 1004-1011.
33. Zúñiga, L.A., et al., *Th17 cell development: from the cradle to the grave*. *Immunological Reviews*, 2013. **252**(1): p. 78-88.
34. Wang, C., et al., *The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut*. *Mucosal Immunology*, 2009. **2**(2): p. 173-183.
35. Eyerich, K., et al., *Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22*. *J Invest Dermatol*, 2008. **128**(11): p. 2640-2645.
36. Yang, X.P., et al., *Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(3): p. 247-54.
37. Dong, C., *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming*. *Nature Reviews Immunology*, 2008. **8**(5): p. 337-348.
38. Zenobia, C. and G. Hajishengallis, *Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation*. *Periodontol 2000*, 2015. **69**(1): p. 142-59.
39. Bettelli, E., M. Oukka, and V.K. Kuchroo, *T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(4): p. 345-50.
40. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. *Science*, 2010. **327**(5969): p. 1098-102.
41. Lexberg, M.H., et al., *IFN-γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(11): p. 3017-27.
42. Kleinewietfeld, M. and D.A. Hafler, *The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity*. *Semin Immunol*, 2013. **25**(4): p. 305-12.
43. Panzer, M., et al., *Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection*. *J Immunol*, 2012. **188**(2): p. 615-23.
44. Stock, P., et al., *Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(11): p. 1149-56.
45. Baron, U., et al., *DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(9): p. 2378-89.
46. Dominguez-Villar, M., C.M. Baecher-Allan, and D.A. Hafler, *Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease*. *Nat Med*, 2011. **17**(6): p. 673-5.
47. Xu, L., et al., *Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta*. *J Immunol*, 2007. **178**(11): p. 6725-9.
48. Yang, X.O., et al., *Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs*. *Immunity*, 2008. **29**(1): p. 44-56.
49. Eastaff-Leung, N., et al., *Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease*. *J Clin Immunol*, 2010. **30**(1): p. 80-9.
50. Beriou, G., et al., *IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function*. *Blood*, 2009. **113**(18): p. 4240-9.

51. Bovenschen, H.J., et al., *Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(9): p. 1853-60.
52. Tovar-Castillo, L.E., et al., *Under-expression of VHL and over-expression of HDAC-1, HIF-1alpha, LL-37, and IAP-2 in affected skin biopsies of patients with psoriasis*. Int J Dermatol, 2007. **46**(3): p. 239-46.
53. Fasching, P., et al., *Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders*. Molecules, 2017. **22**(1): p. 134.
54. Gibbs, S., *Skin disease and socioeconomic conditions in rural Africa: Tanzania*. Int J Dermatol, 1996. **35**(9): p. 633-9.
55. Danielsen, K., et al., *Is the prevalence of psoriasis increasing? A 30-year follow-up of a population-based cohort*. Br J Dermatol, 2013. **168**(6): p. 1303-10.
56. Schäfer, I., et al., *Epidemiologie der Psoriasis in Deutschland-Auswertung von Sekundärdaten einer gesetzlichen Krankenversicherung*. Gesundheitswesen, 2010. **72**.
57. Schlander, M., et al., *PSS21 ADMINISTRATIVE PREVALENCE OF PSORIASIS IN GERMANY*. Value in Health, 2008. **11**(6): p. A615-A616.
58. Henseler, T. and E. Christophers, *Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris*. J Am Acad Dermatol, 1985. **13**(3): p. 450-6.
59. Nevitt, G.J. and P.E. Hutchinson, *Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease*. Br J Dermatol, 1996. **135**(4): p. 533-7.
60. Michalek, I., B. Loring, and S. John, *WHO Global report on psoriasis*. 2016.
61. Harden, J.L., J.G. Krueger, and A.M. Bowcock, *The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2015. **64**: p. 66-73.
62. Lande, R., et al., *The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5621.
63. Boehncke, W.-H. and M.P. Schön, *Psoriasis*. The Lancet, 2015. **386**(9997): p. 983-994.
64. Chiricozzi, A., et al., *Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
65. Samotij, D., et al., *Pathogenesis of psoriasis in the "omic" era. Part I. Epidemiology, clinical manifestation, immunological and neuroendocrine disturbances*. Postepy Dermatol Alergol, 2020. **37**(2): p. 135-153.
66. Prof. Dr. med. Peter Altmeyer, P.D.M.B.-B., Dr. med. S. Leah Schröder-Bergmann. *Psoriasis*. 2021 18.06.2023 10.07.2023]; Zugriff über: <https://www.altmeyers.org/de/dermatologie/psoriasis-3339>.
67. Puzenat, E., et al., *What are the best outcome measures for assessing plaque psoriasis severity? A systematic review of the literature*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2010. **24** **Suppl 2**: p. 10-6.
68. Mrowietz, U., et al., *Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus*. Arch Dermatol Res, 2011. **303**(1): p. 1-10.
69. Nast, A., et al., *Deutsche S3-Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris, adaptiert von EuroGuiDerm – Teil 1: Therapieziele und Therapieempfehlungen*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2021. **19**: p. 934-951.
70. Langley, R.G., et al., *Secukinumab in Plaque Psoriasis — Results of Two Phase 3 Trials*. New England Journal of Medicine, 2014. **371**(4): p. 326-338.
71. Adami, S., et al., *The role of interleukin-17A in psoriatic disease*. BioDrugs, 2014. **28**(6): p. 487-97.
72. Ha, H.L., et al., *IL-17 drives psoriatic inflammation via distinct, target cell-specific mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(33): p. E3422-31.
73. Soler, D.C. and T.S. McCormick, *The Dark Side of Regulatory T Cells in Psoriasis*. The Journal of Investigative Dermatology, 2011. **131**(9): p. 1785-1786.
74. Ma, L., et al., *Notch1 Signaling Regulates the Th17/Treg Immune Imbalance in Patients with Psoriasis Vulgaris*. Mediators Inflamm, 2018. **2018**: p. 3069521.
75. Langley, R.G., et al., *Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials*. N Engl J Med, 2014. **371**(4): p. 326-38.
76. Weltärztebund (World Medical Association, W.), *WMA Deklaration von Helsinki - Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen*. 2013.

77. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.* Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
78. Bharadwaj, M., N. Mifsud, and J. McCluskey, *Detection and Characterisation of Alloreactive T Cells.* Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2012. **882**: p. 309-37.
79. Pedreira, C.E., et al., *Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges.* Trends in Biotechnology, 2013. **31**(7): p. 415-425.
80. Castagna, M., et al., *Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters.* J Biol Chem, 1982. **257**(13): p. 7847-51.
81. Chatila, T., et al., *Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin.* J Immunol, 1989. **143**(4): p. 1283-9.
82. Rajamahanty, S., et al., *Growth inhibition of androgen-responsive prostate cancer cells with brefeldin A targeting cell cycle and androgen receptor.* J Biomed Sci, 2010. **17**: p. 5.
83. Stanciu, L.A. and R. Djukanović, *Isolation of T-Cell Subsets by Magnetic Cell Sorting (MACS),* in *T Cell Protocols: Development and Activation*, K.P. Kearse, Editor. 2000, Humana Press: Totowa, NJ. p. 133-141.
84. Miltenyi Biotec GmbH. *Large Cell Columns.* 2023 [10.07.2023]; Zugriff über: <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation/columns/large-cell-columns-1.aspx>.
85. Garbrecht, F.C., C. Russo, and M.E. Weksler, *Long-term growth of human T cell lines and clones on anti-CD3 antibody-treated tissue culture plates.* J Immunol Methods, 1988. **107**(1): p. 137-42.
86. Linsley, P.S. and J.A. Ledbetter, *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen.* Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 191-212.
87. Leipe, J., et al., *Increased plasticity of non-classic Th1 cells toward the Th17 phenotype.* Modern Rheumatology, 2020. **30**(5): p. 930-936.
88. Guo, R., et al., *Lymphocyte mass cytometry identifies a CD3-CD4+ cell subset with a potential role in psoriasis.* JCI Insight, 2019. **4**(6).
89. Weiskopf, D., B. Weinberger, and B. Grubeck-Loebenstein, *The aging of the immune system.* Transpl Int, 2009. **22**(11): p. 1041-50.
90. Solberg, S.M., et al., *Mass cytometry analysis of blood immune cells from psoriasis patients on biological therapy.* European Journal of Immunology, 2021. **51**(3): p. 694-702.
91. Sathaliyawala, T., et al., *Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets.* Immunity, 2013. **38**(1): p. 187-97.
92. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets.* European Journal of Immunology, 2013. **43**(11): p. 2797-2809.
93. Homey, B., et al., *Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis.* J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6621-32.
94. Hedrick, M.N., et al., *CCR6 as a possible therapeutic target in psoriasis.* Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2010. **14**(9): p. 911-922.
95. Benham, H., et al., *Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis.* Arthritis Research & Therapy, 2013. **15**(5): p. R136.
96. Diani, M., et al., *Increased frequency of activated CD8+ T cell effectors in patients with psoriatic arthritis.* Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 10870.
97. Wang, Y., et al., *Altered circulating T follicular helper cell subsets in patients with psoriasis vulgaris.* Immunology Letters, 2017. **181**: p. 101-108.
98. Robert, R., et al., *Essential role for CCR6 in certain inflammatory diseases demonstrated using specific antagonist and knockin mice.* JCI Insight, 2017. **2**(15).
99. Hatano, Y., K. Katagiri, and S. Takayasu, *Decreased levels of CXCR3 transcripts in peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic dermatitis and with cutaneous diseases associated with eosinophilia.* Archives of Dermatological Research, 2001. **293**(6): p. 319-322.
100. Lima, X.T., et al., *Circulating levels of chemokines in psoriasis.* Autoimmunity, 2015. **48**(1): p. 57-60.
101. Chen, S.-C., et al., *Expression of chemokine receptor CXCR3 by lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells in human psoriatic lesions.* Archives of Dermatological Research, 2010. **302**(2): p. 113-123.

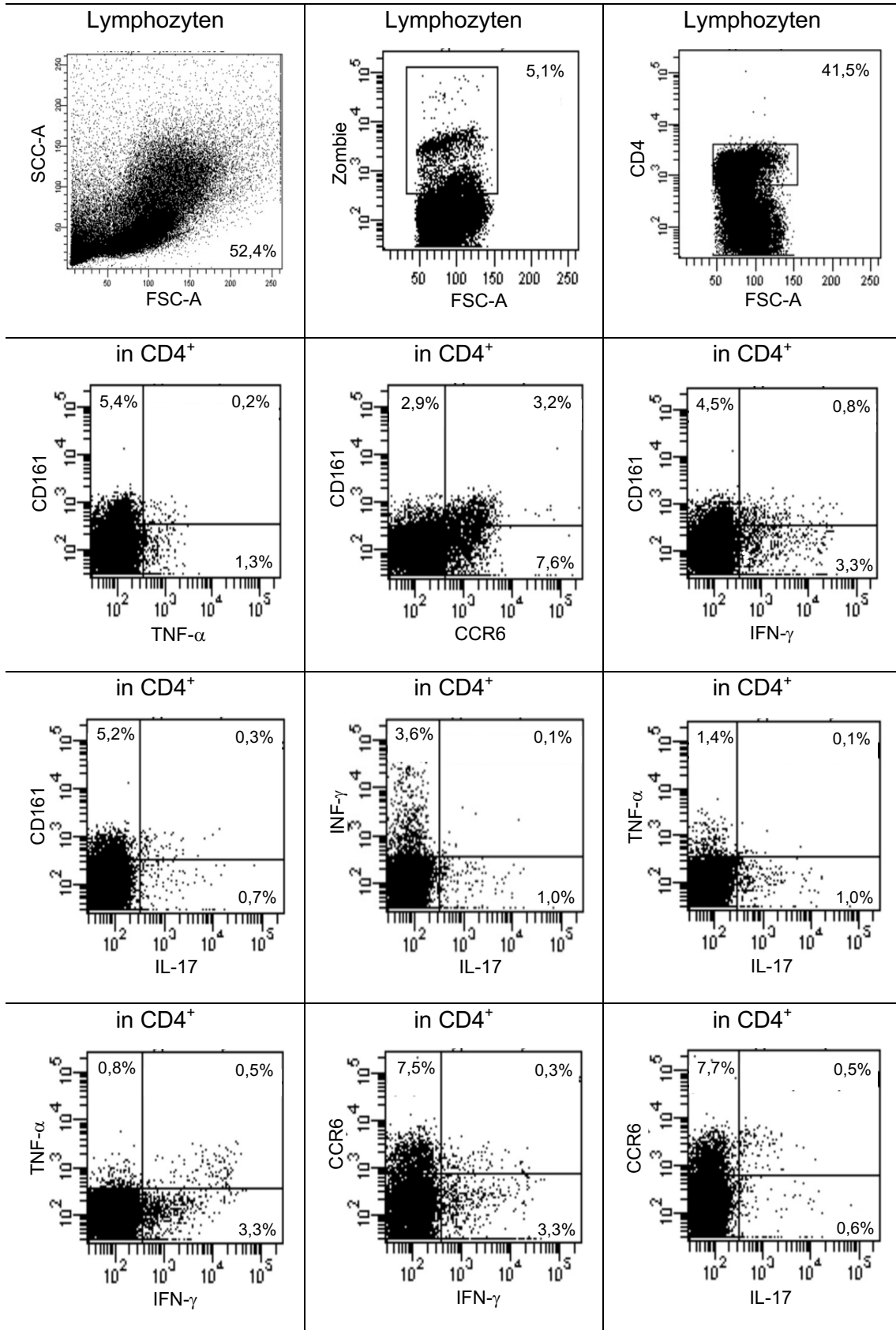
102. Rottman, J.B., et al., *Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin alphaEbeta7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris*. *Lab Invest*, 2001. **81**(3): p. 335-47.
103. Fan, X., et al., *Is CCR7 a potential target for biologic therapy in psoriasis? Increased expression of CCR7 in psoriasis vulgaris*. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2008. **74**(5): p. 550.
104. Bosè, F., et al., *Inhibition of CCR7/CCL19 axis in lesional skin is a critical event for clinical remission induced by TNF blockade in patients with psoriasis*. *Am J Pathol*, 2013. **183**(2): p. 413-21.
105. Van Raemdonck, K., et al., *CCL21/CCR7 signaling in macrophages promotes joint inflammation and Th17-mediated osteoclast formation in rheumatoid arthritis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020. **77**(7): p. 1387-1399.
106. Brandum, E.P., et al., *Dendritic Cells and CCR7 Expression: An Important Factor for Autoimmune Diseases, Chronic Inflammation, and Cancer*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(15): p. 8340.
107. Yawalkar, N., et al., *Perforin and granzyme B may contribute to skin inflammation in atopic dermatitis and psoriasis*. *British Journal of Dermatology*, 2001. **144**(6): p. 1133-1139.
108. Prpić Massari, L., et al., *Analysis of perforin expression in peripheral blood and lesions in severe and mild psoriasis*. *Journal of Dermatological Science*, 2007. **47**(1): p. 29-36.
109. Kamata, Y., et al., *Relationships among plasma granzyme B level, pruritus and dermatitis in patients with atopic dermatitis*. *Journal of Dermatological Science*, 2016. **84**(3): p. 266-271.
110. Vičić, M., et al., *Cytotoxic T lymphocytes as a potential brake of keratinocyte proliferation in psoriasis*. *Medical Hypotheses*, 2016. **87**: p. 66-68.
111. Lima, X.T., et al., *Frequency and characteristics of circulating CD4(+) CD28(null) T cells in patients with psoriasis*. *Br J Dermatol*, 2015. **173**(4): p. 998-1005.
112. Arican, O., et al., *Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity*. *Mediators Inflamm*, 2005. **2005**(5): p. 273-9.
113. Harden, J.L., et al., *Humanized anti-IFN-gamma (HuZAF) in the treatment of psoriasis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2015. **135**(2): p. 553-6.
114. Sofen, H., et al., *Guselkumab (an IL-23-specific mAb) demonstrates clinical and molecular response in patients with moderate-to-severe psoriasis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2014. **133**(4): p. 1032-40.
115. Mehta, N.N., et al., *IFN-gamma and TNF-alpha synergism may provide a link between psoriasis and inflammatory atherogenesis*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 13831.
116. Ettehadi, P., et al., *Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions*. *Clin Exp Immunol*, 1994. **96**(1): p. 146-51.
117. Bonifati, C., et al., *Correlated increases of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and granulocyte monocyte-colony stimulating factor levels in suction blister fluids and sera of psoriatic patients--relationships with disease severity*. *Clin Exp Dermatol*, 1994. **19**(5): p. 383-7.
118. Mussi, A., et al., *Serum TNF-alpha levels correlate with disease severity and are reduced by effective therapy in plaque-type psoriasis*. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1997. **11**(3): p. 115-8.
119. Abanmi, A., et al., *Serum levels of proinflammatory cytokines in psoriasis patients from Saudi Arabia*. *Int J Dermatol*, 2005. **44**(1): p. 82-3.
120. Balato, A., et al., *Effects of adalimumab therapy in adult subjects with moderate-to-severe psoriasis on Th17 pathway*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2014. **28**(8): p. 1016-24.
121. Zaba, L.C., et al., *Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(1): p. 79-88.
122. Di Meglio, P., et al., *Targeting CD8(+) T cells prevents psoriasis development*. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. **138**(1): p. 274-276.e6.
123. Hijnen, D., et al., *CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN-gamma, IL-13, IL-17, and IL-22*. *J Invest Dermatol*, 2013. **133**(4): p. 973-9.

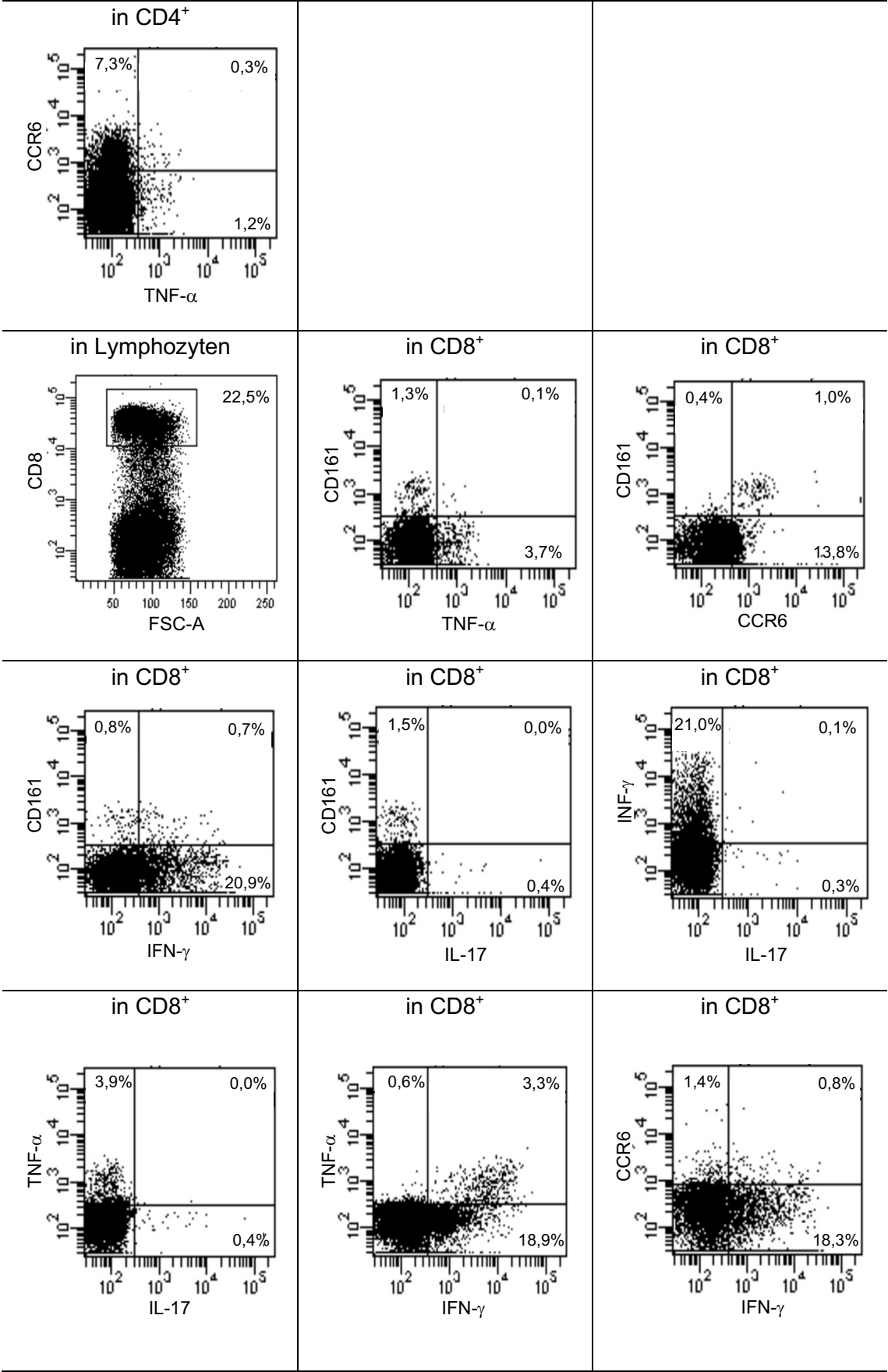
124. Hao, Z., et al., *The diagnostic significance of PGGT1B in psoriasis*. Dermatologic Therapy, 2021. **34**(2): p. e14854.
125. Kagami, S., et al., *Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(5): p. 1373-83.
126. Cai, Y., C. Fleming, and J. Yan, *New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(4): p. 302-9.
127. Brunner, P.M., et al., *Infliximab induces downregulation of the IL-12/IL-23 axis in 6-sulfo-LacNac (slan)+ dendritic cells and macrophages*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(5): p. 1184-1193.e8.
128. Furiati, S.C., et al., *Th1, Th17, and Treg Responses are Differently Modulated by TNF-alpha Inhibitors and Methotrexate in Psoriasis Patients*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 7526.
129. Priyadarssini, M., L. Chandrashekar, and M. Rajappa, *Effect of methotrexate monotherapy on T-cell subsets in the peripheral circulation in psoriasis*. Clinical and Experimental Dermatology, 2019. **44**(5): p. 491-497.
130. den Braanker, H., et al., *Characterizing memory T helper cells in patients with psoriasis, subclinical, or early psoriatic arthritis using a machine learning algorithm*. Arthritis Research & Therapy, 2022. **24**(1): p. 28.
131. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
132. Kotake, S., et al., *The Plasticity of Th17 Cells in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis*. Journal of Clinical Medicine, 2017. **6**(7): p. 67.
133. Cosmi, L., et al., *Th17 plasticity: pathophysiology and treatment of chronic inflammatory disorders*. Current Opinion in Pharmacology, 2014. **17**: p. 12-16.
134. Mattozzi, C., et al., *Peripheral blood regulatory T cell measurements correlate with serum vitamin D level in patients with psoriasis*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016. **20**(9): p. 1675-9.
135. Yun, W.J., et al., *Role of CD4CD25FOXP3 Regulatory T Cells in Psoriasis*. Ann Dermatol, 2010. **22**(4): p. 397-403.
136. Pawlaczyk, M., J. Karczewski, and K. Wiktorowicz, *T regulatory CD4+CD25high lymphocytes in peripheral blood of patients suffering from psoriasis*. Postepy Dermatologii i Alergologii, 2010. **27**: p. 25-28.
137. Zhang, L., et al., *Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity*. Clin Immunol, 2010. **135**(1): p. 108-17.
138. Fujimura, T., et al., *Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides*. Br J Dermatol, 2008. **158**(6): p. 1256-63.
139. Deng, G., et al., *Foxp3 Post-translational Modifications and Treg Suppressive Activity*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**.
140. Zhao, M., et al., *Up-regulation of microRNA-210 induces immune dysfunction via targeting FOXP3 in CD4+ T cells of psoriasis vulgaris*. Clinical Immunology, 2014. **150**(1): p. 22-30.
141. Yan, K., et al., *Methotrexate restores the function of peripheral blood regulatory T cells in psoriasis vulgaris via the CD73/AMPK/mTOR pathway*. Br J Dermatol, 2018. **179**(4): p. 896-905.
142. Kuang, Y., et al., *[Effect of methotrexate on regulation for the number of regulatory T cells and expression of Foxp3 in psoriasis]*. Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences, 2018. **43**(8): p. 835-842.
143. Kanda, N., T. Hoashi, and H. Saeki, *The Defect in Regulatory T Cells in Psoriasis and Therapeutic Approaches*. Journal of Clinical Medicine, 2021. **10**(17): p. 3880.
144. Hirahara, K. and T. Nakayama, *CD4(+) T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the T(h)1/T(h)2 paradigm*. Int Immunol, 2016. **28**(4): p. 163-71.
145. Kim, J., et al., *Molecular Phenotyping Small (Asian) versus Large (Western) Plaque Psoriasis Shows Common Activation of IL-17 Pathway Genes but Different Regulatory Gene Sets*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(1): p. 161-172.
146. Sugiyama, H., et al., *Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 164-73.

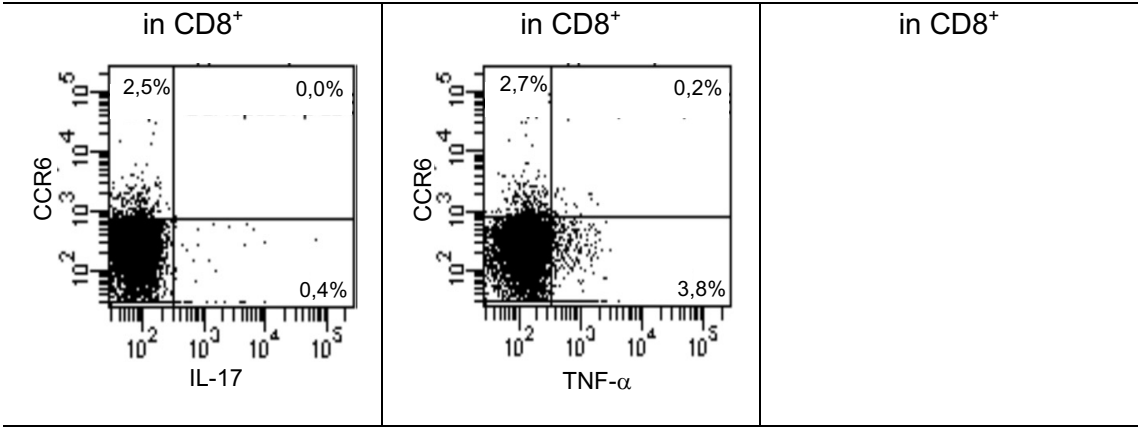
147. Koenen, H.J., et al., *Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells*. Blood, 2008. **112**(6): p. 2340-52.
148. Kannan, A.K., et al., *IL-23 induces regulatory T cell plasticity with implications for inflammatory skin diseases*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 17675.
149. Pietraforte, I. and L. Frasca, *Autoreactive T-Cells in Psoriasis: Are They Spoiled Tregs and Can Therapies Restore Their Functions?* International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(5): p. 4348.
150. Shimizu, T., et al., *Anti-IL-17A and IL-23p19 antibodies but not anti-TNFalpha antibody induce expansion of regulatory T cells and restoration of their suppressive function in imiquimod-induced psoriasiform dermatitis*. J Dermatol Sci, 2019. **95**(3): p. 90-98.
151. Diluvio, L., et al., *Infliximab therapy induces increased polyclonality of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in psoriasis*. Br J Dermatol, 2010. **162**(4): p. 895-7.
152. Wang, J., et al., *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 129-38.
153. Morgan, M.E., et al., *Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans*. Human Immunology, 2005. **66**(1): p. 13-20.
154. Kitani, A. and L. Xu, *Regulatory T cells and the induction of IL-17*. Mucosal Immunology, 2008. **1**(1): p. S43-S46.
155. Almanzar, G., et al., *Disease Manifestation and Inflammatory Activity as Modulators of Th17/Treg Balance and RORC/FoxP3 Methylation in Systemic Sclerosis*. Int Arch Allergy Immunol, 2016. **171**(2): p. 141-154.
156. Lal, G. and J.S. Bromberg, *Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression*. Blood, 2009. **114**(18): p. 3727-35.
157. Marek, N., et al., *The time is crucial for ex vivo expansion of T regulatory cells for therapy*. Cell transplantation, 2011. **20**(11-12): p. 1747-1758.
158. Zhang, L., et al., *Characterization of Th17 and FoxP3⁺ Treg Cells in Paediatric Psoriasis Patients*. Scandinavian Journal of Immunology, 2016. **83**(3): p. 174-180.
159. Tsiogkas, S.G., et al., *A sharp decrease of Th17, CXCR3⁺-Th17, and Th17.1 in peripheral blood is associated with an early anti-IL-17-mediated clinical remission in psoriasis*. Clinical and Experimental Immunology, 2022. **210**(1): p. 79-89.
160. Chong, W.P., et al., *Essential role of IL-17A in Tregs induction in autoimmune uveitis*. The Journal of Immunology, 2019. **202**(1_Supplement): p. 116.6-116.6.
161. Chong, W.P., et al., *The Cytokine IL-17A Limits Th17 Pathogenicity via a Negative Feedback Loop Driven by Autocrine Induction of IL-24*. Immunity, 2020. **53**(2): p. 384-397.e5.
162. Crawford, M.P., et al., *CD4 T cell-intrinsic role for the T helper 17 signature cytokine IL-17: Effector resistance to immune suppression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020. **117**(32): p. 19408-19414.
163. Holzer, M.T., et al., *Mitigated suppressive function of regulatory T cells (Treg) upon Th17-inducing cytokines in oligo- and polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) patients*. Pediatr Rheumatol Online J, 2022. **20**(1): p. 26.
164. Almanzar, G., et al., *Memory CD4⁺ T cells lacking expression of CCR7 promote pro-inflammatory cytokine production in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis*. Eur J Dermatol, 2019. **29**(5): p. 468-476.
165. Cunnusamy, K., et al., *Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory CD8⁺ T cells*. Clin Immunol, 2014. **152**(1-2): p. 115-26.
166. Schneider, A., et al., *The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7350-5.
167. Bhela, S., et al., *Nonapoptotic and extracellular activity of granzyme B mediates resistance to regulatory T cell (Treg) suppression by HLA-DR-CD25^{hi}CD127^{lo} Tregs in multiple sclerosis and in response to IL-6*. J Immunol, 2015. **194**(5): p. 2180-9.
168. Schneider, A., et al., *In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling*. Sci Transl Med, 2013. **5**(170): p. 170ra15.

7 Anhang

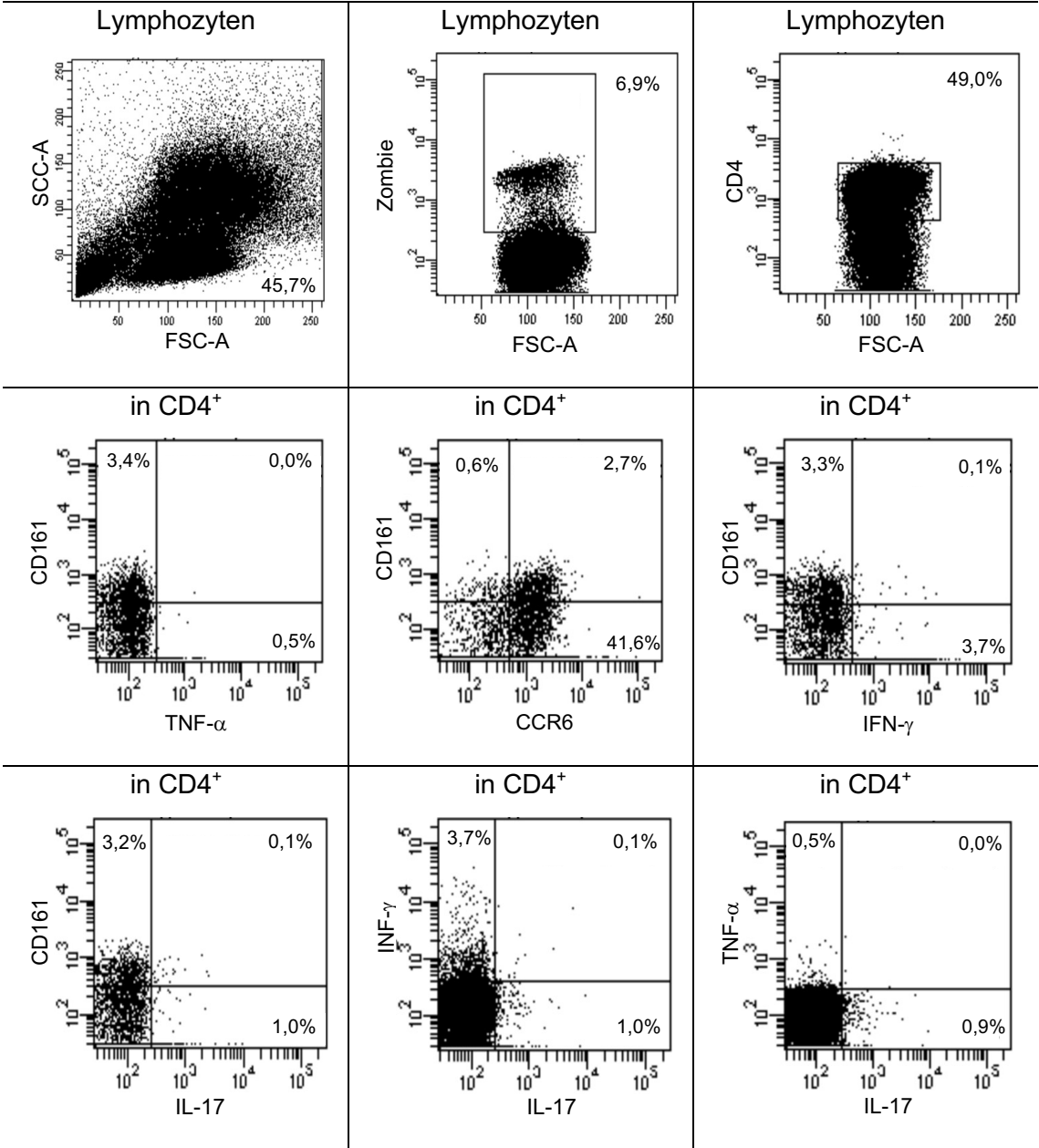
HC – Färbung 1

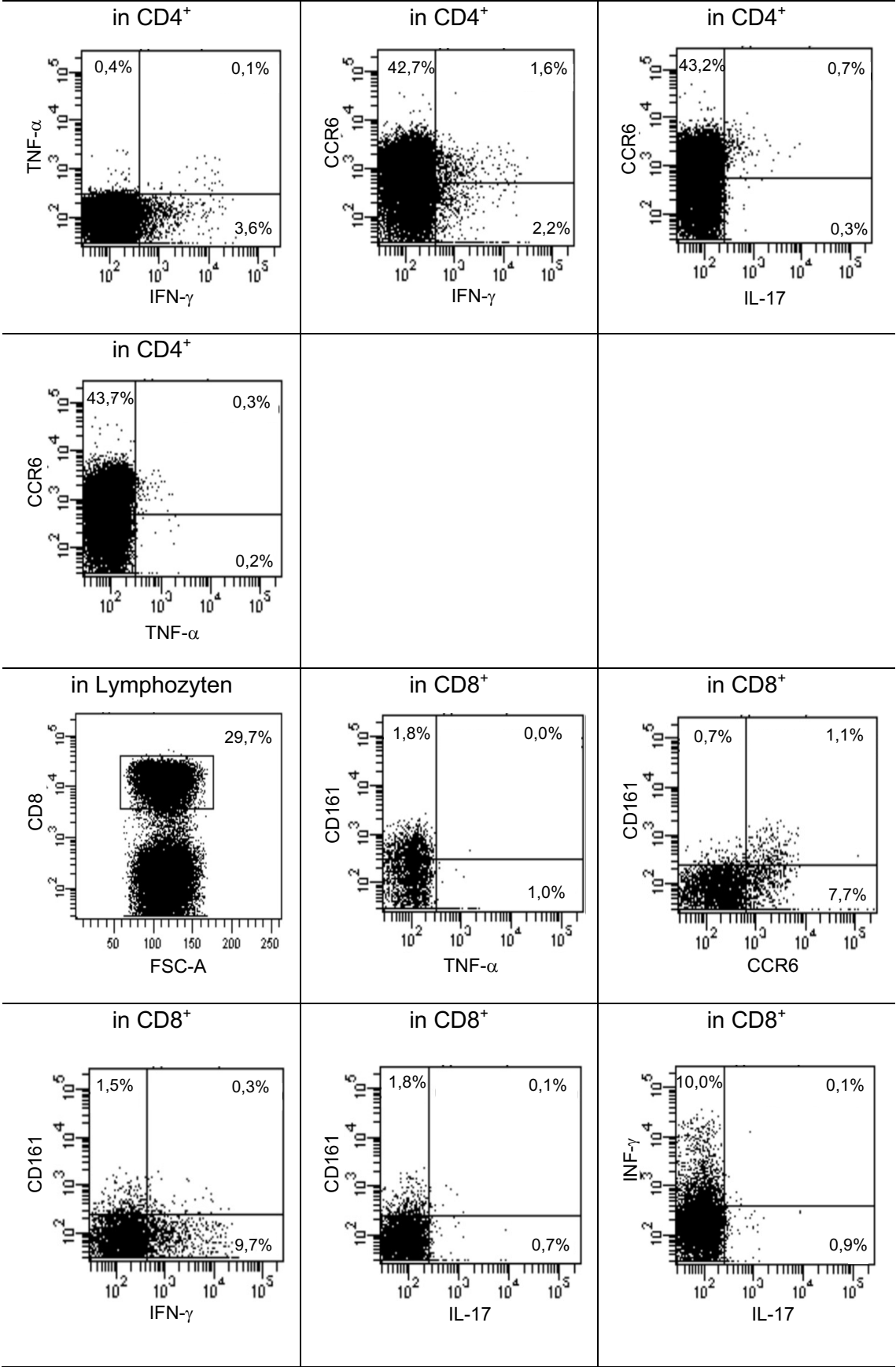


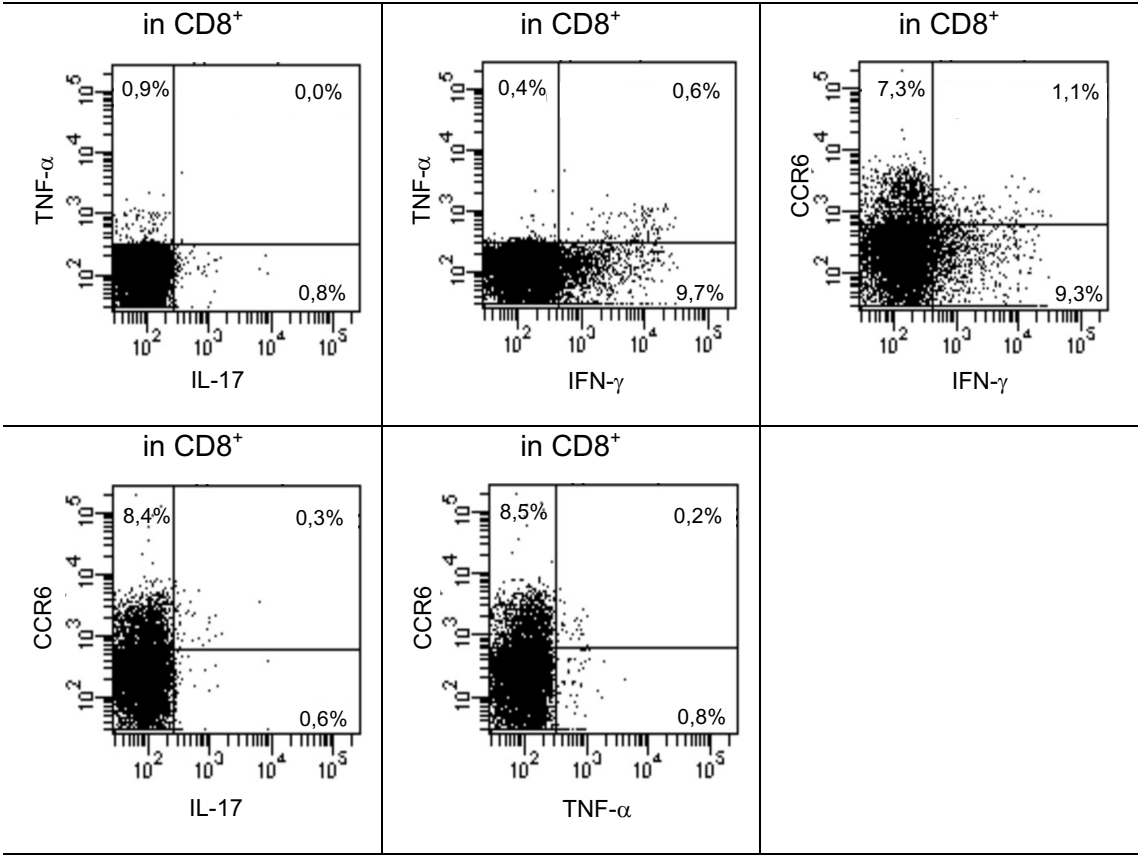




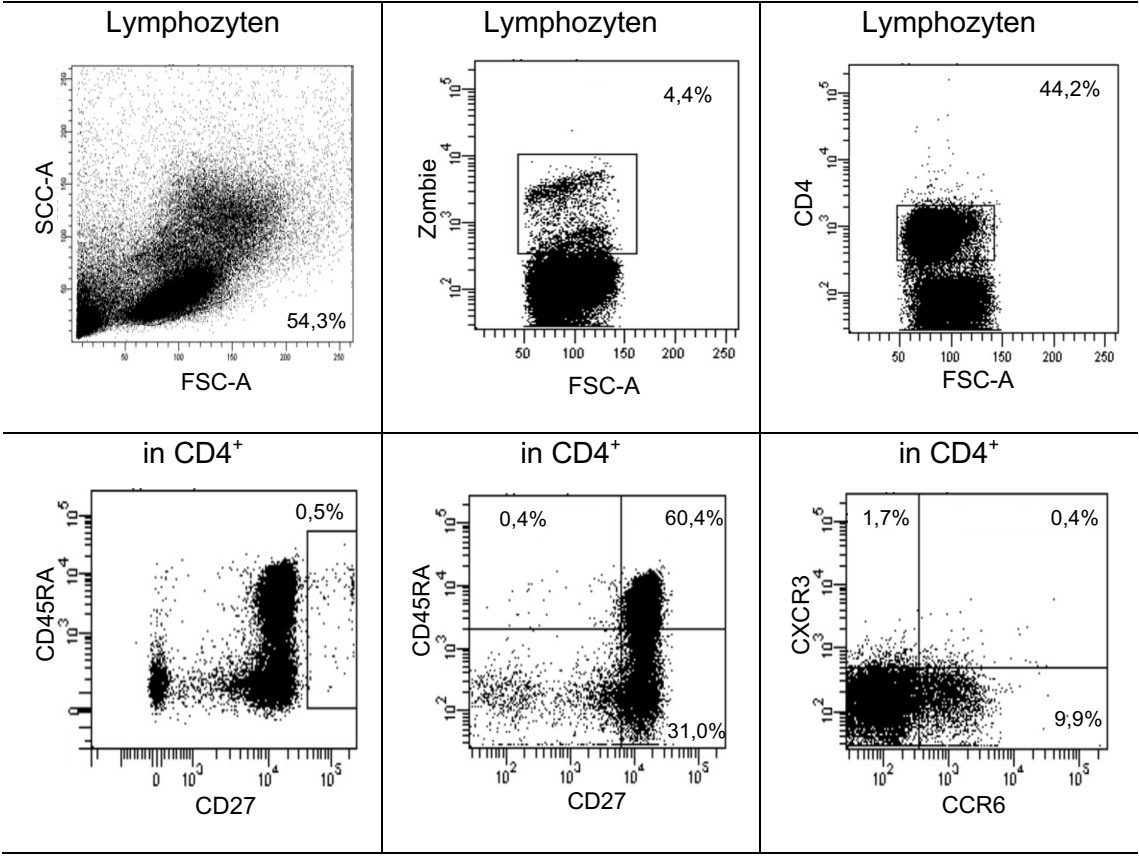
PSO – Färbung 1

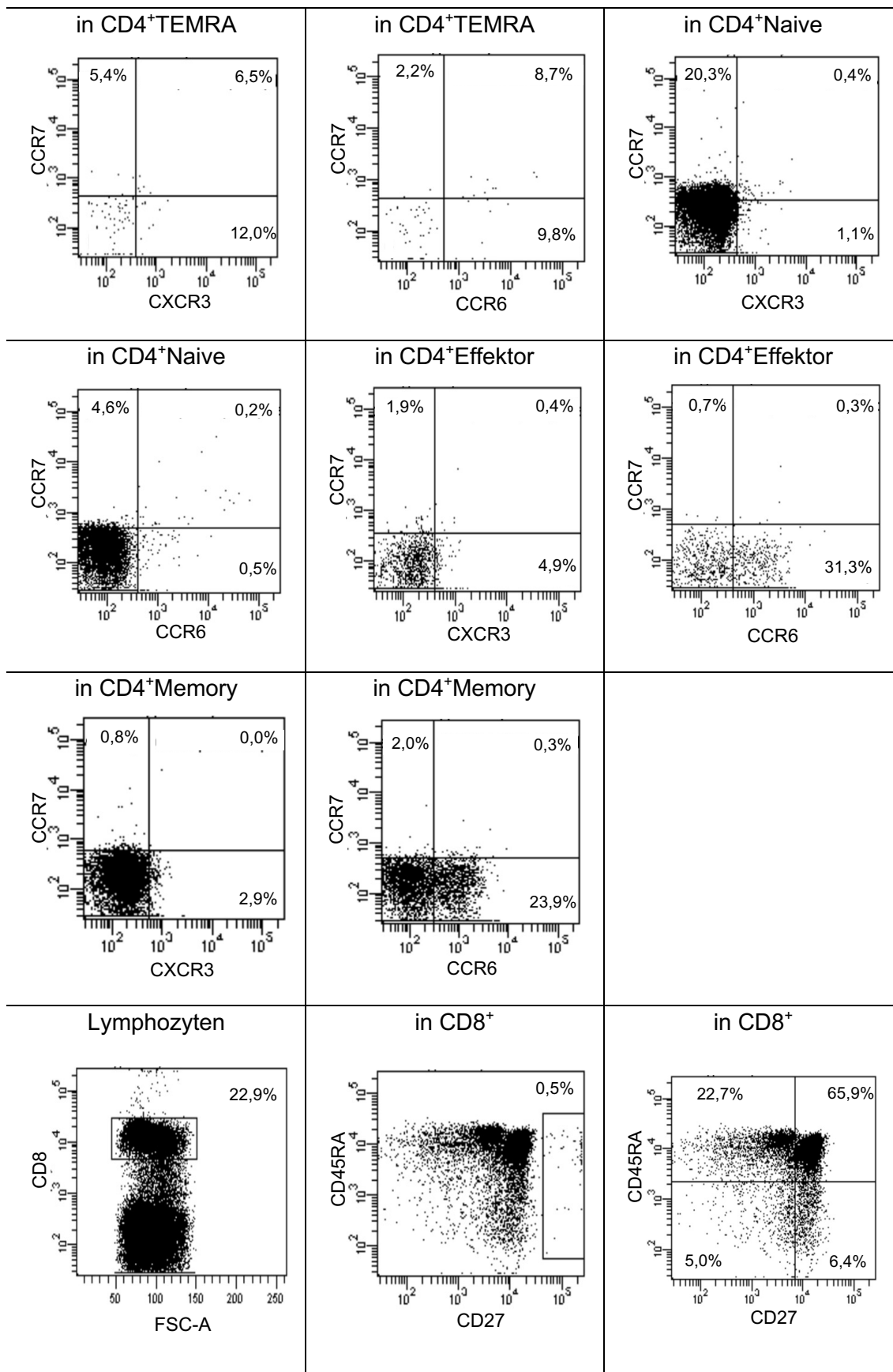


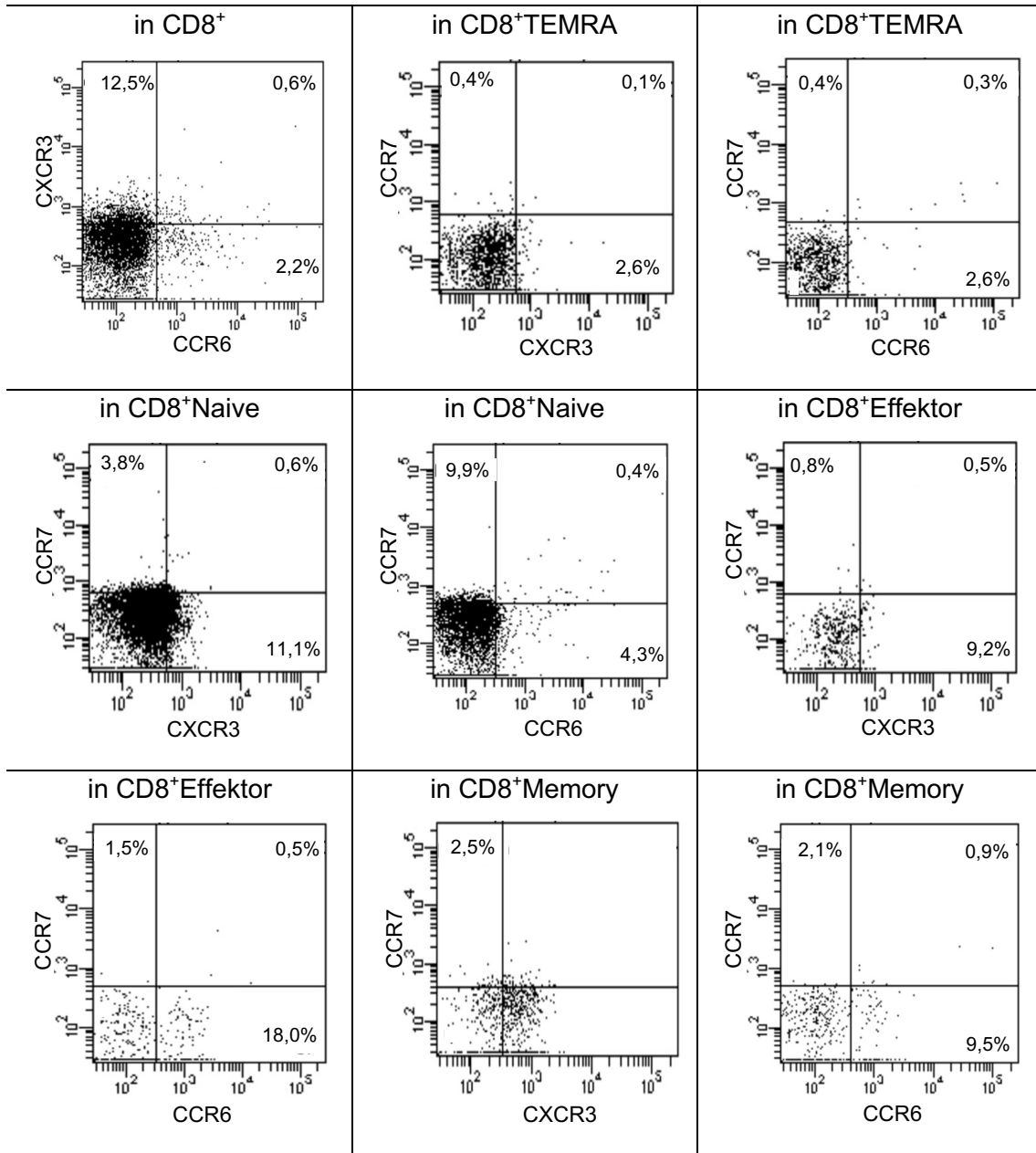




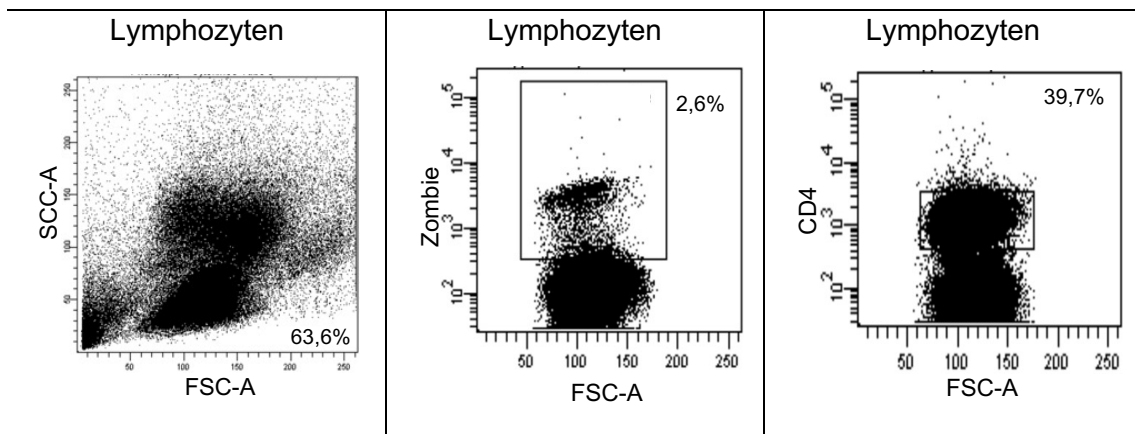
HC – Färbung 2

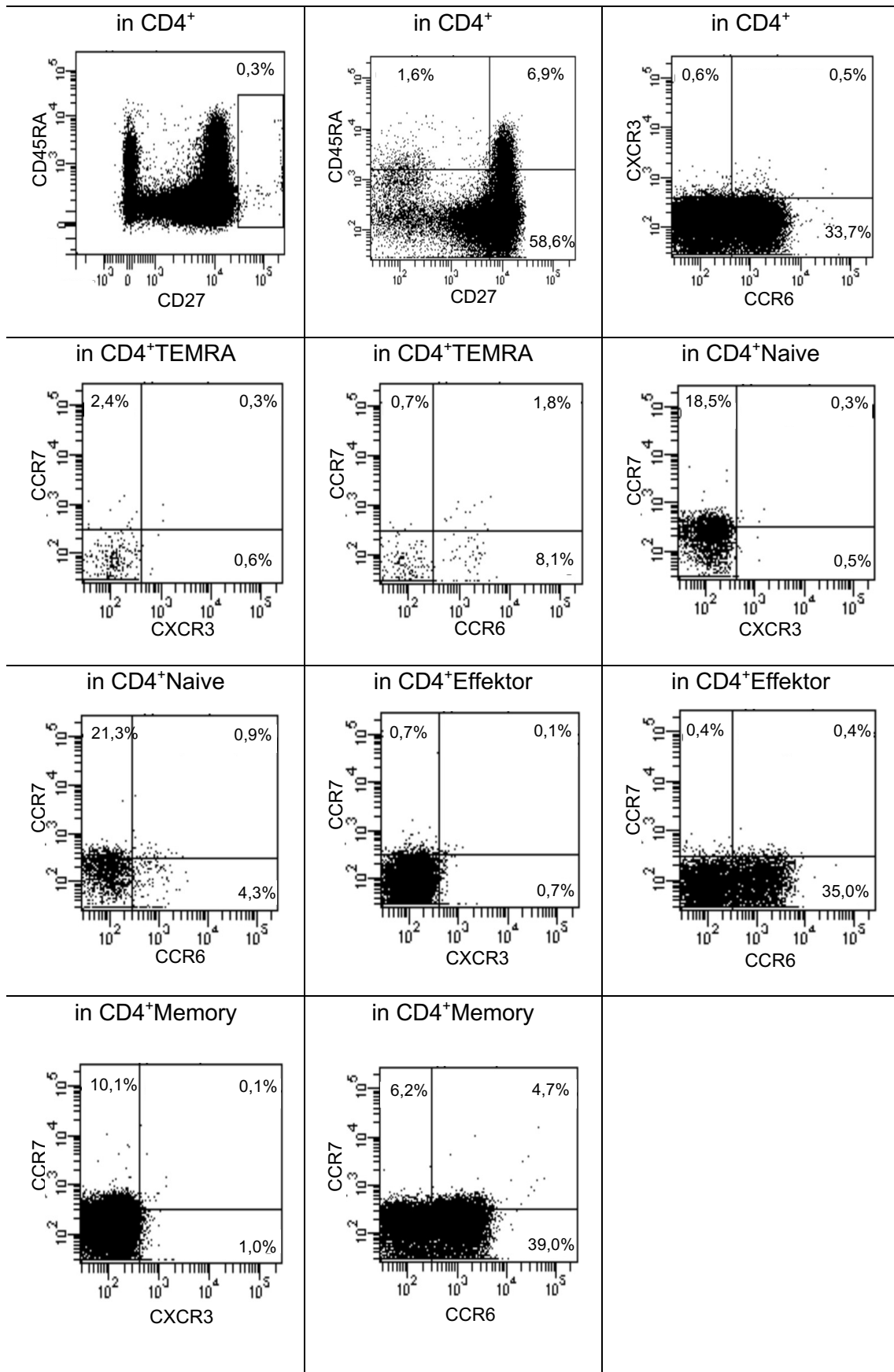


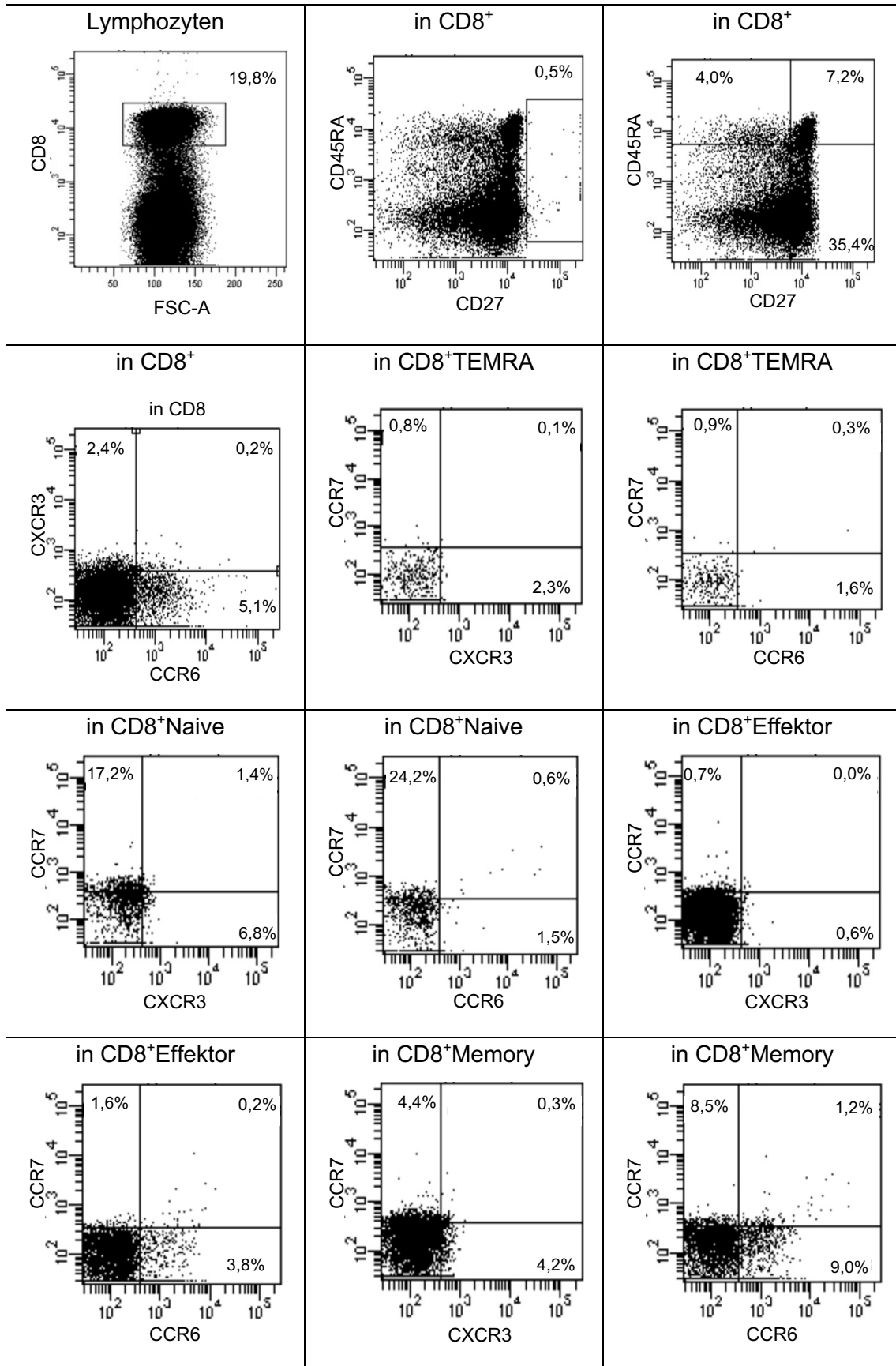




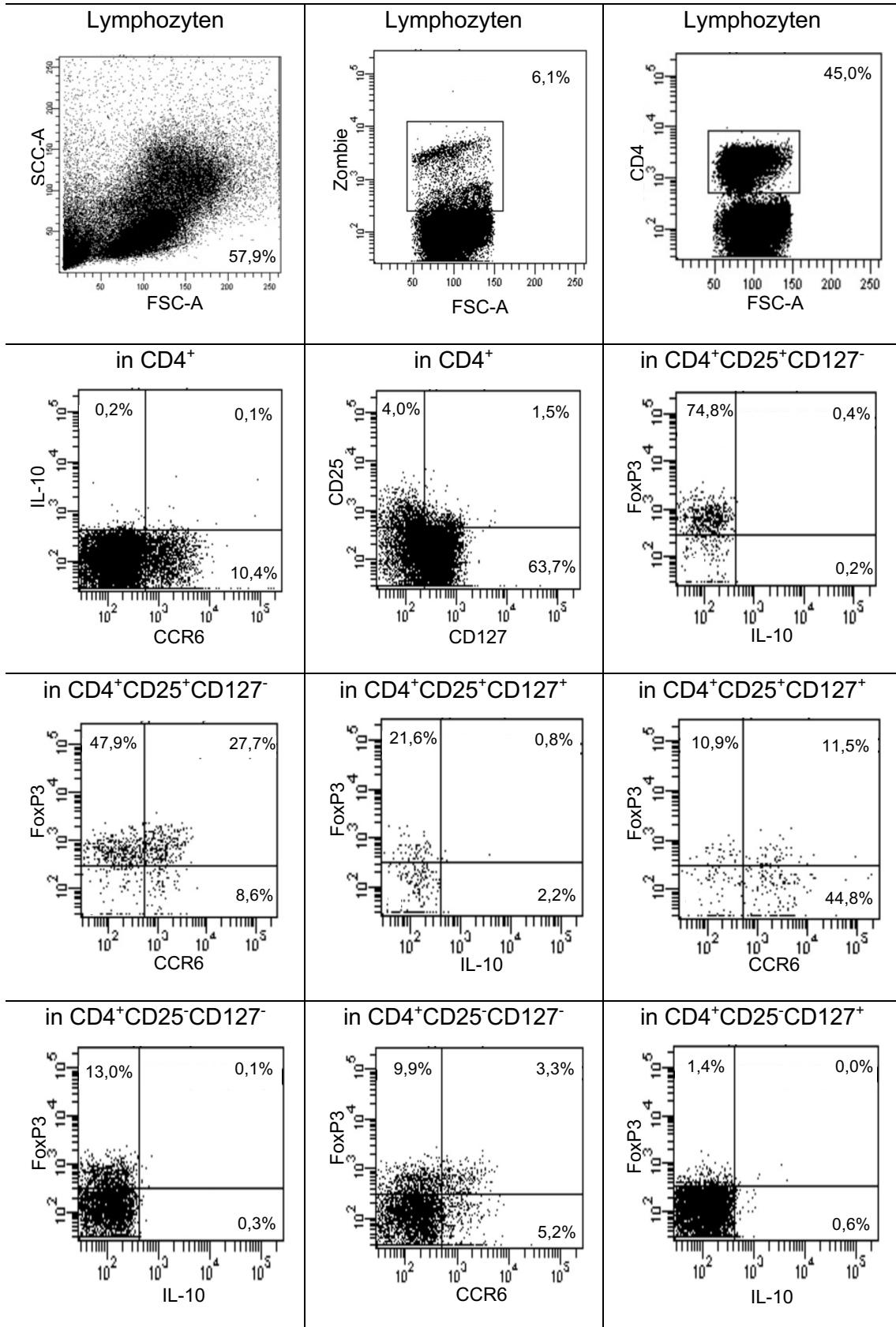
PSO – Färbung 2

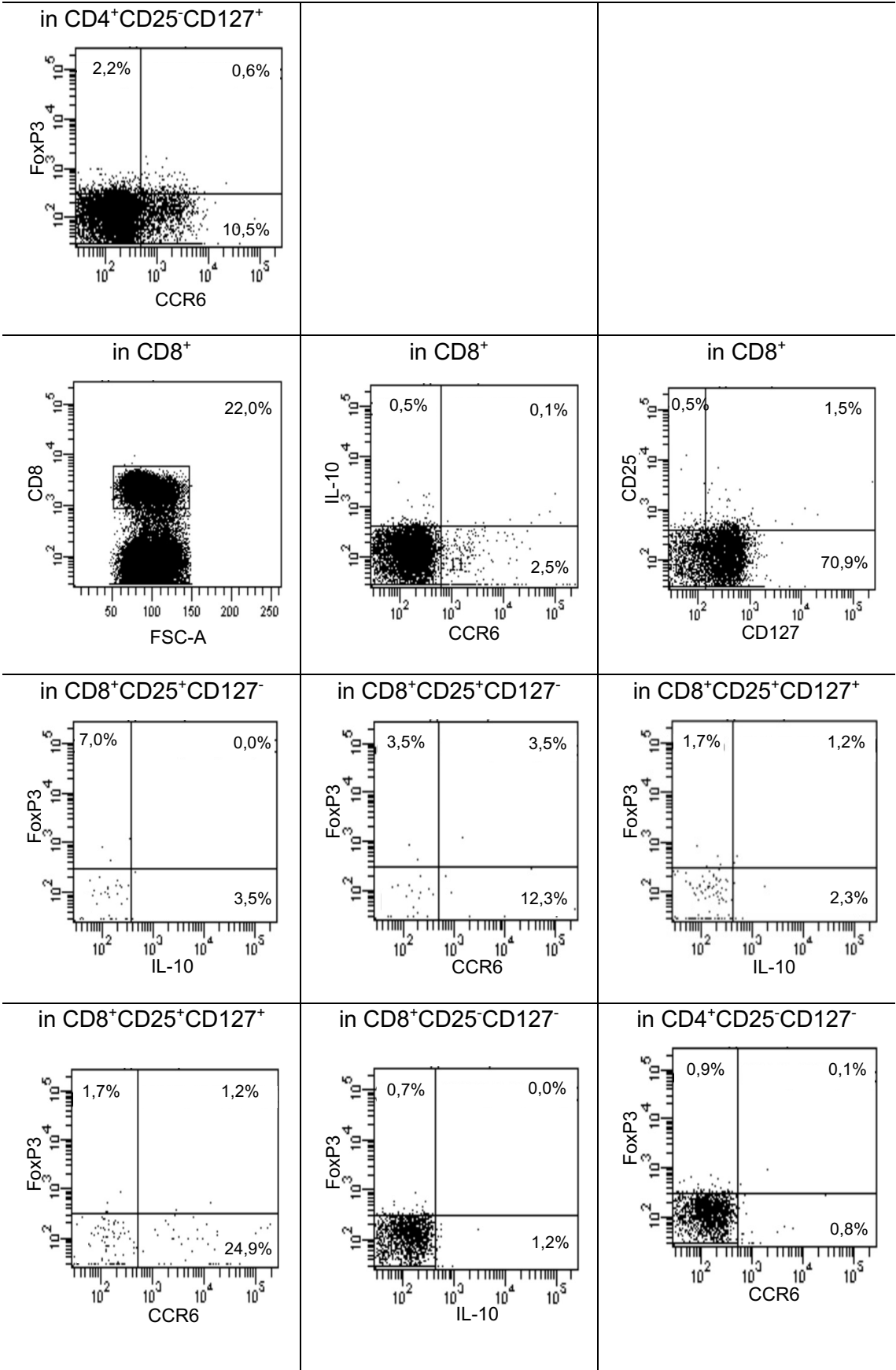


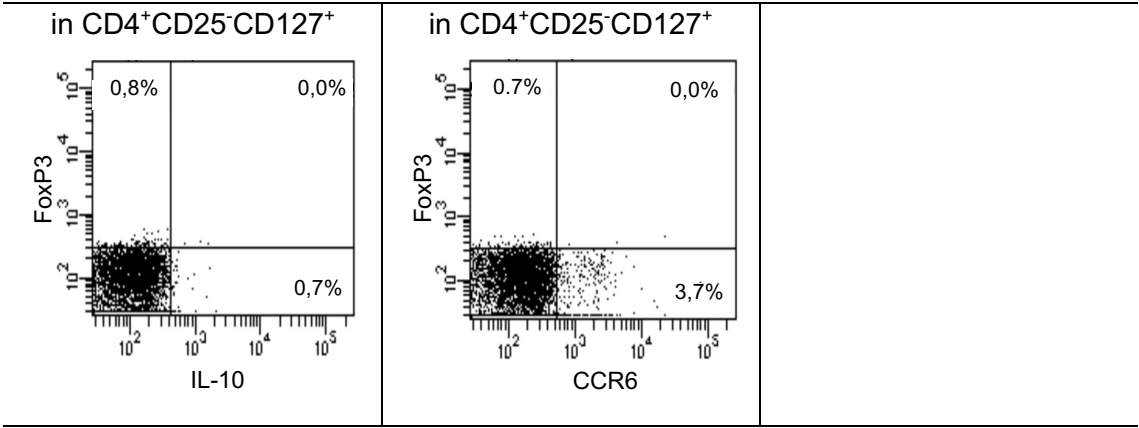




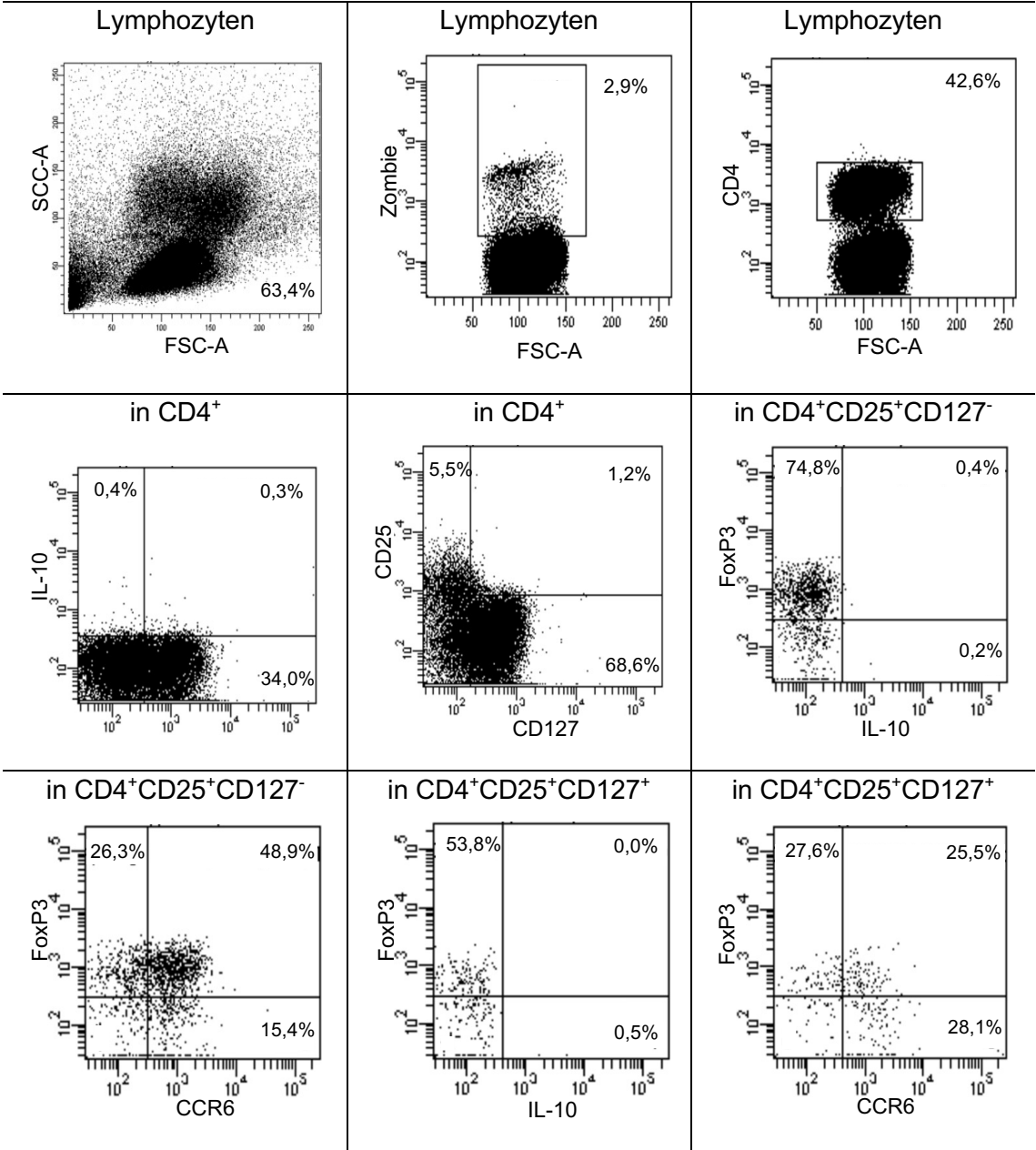
HC – Färbung 3

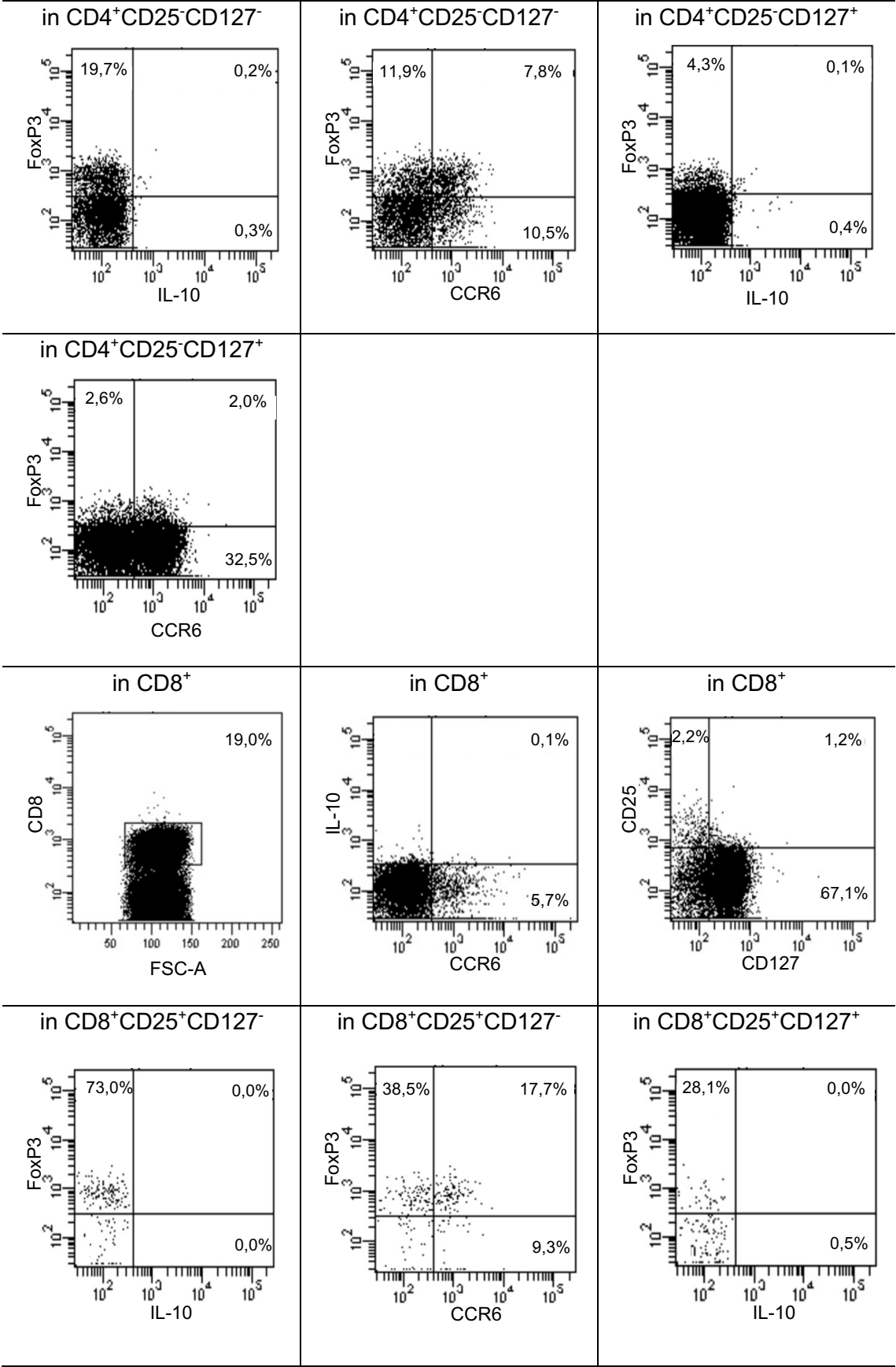


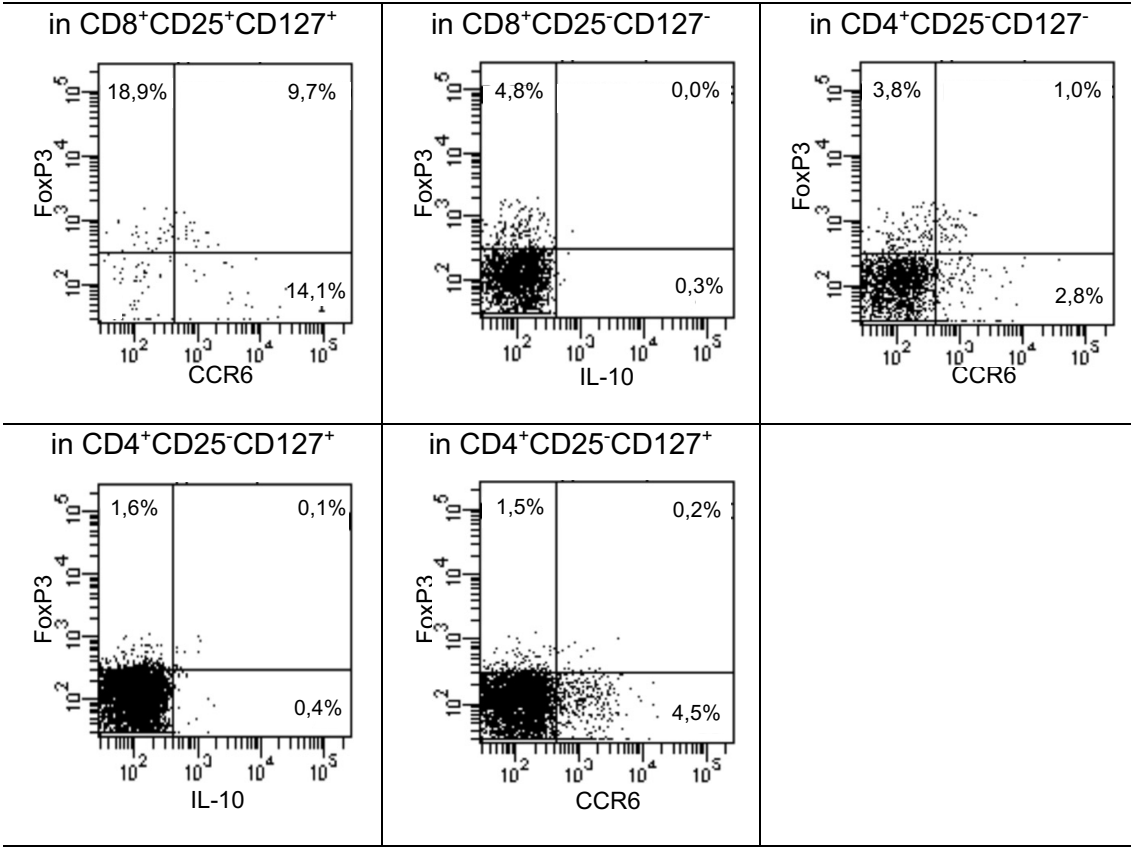




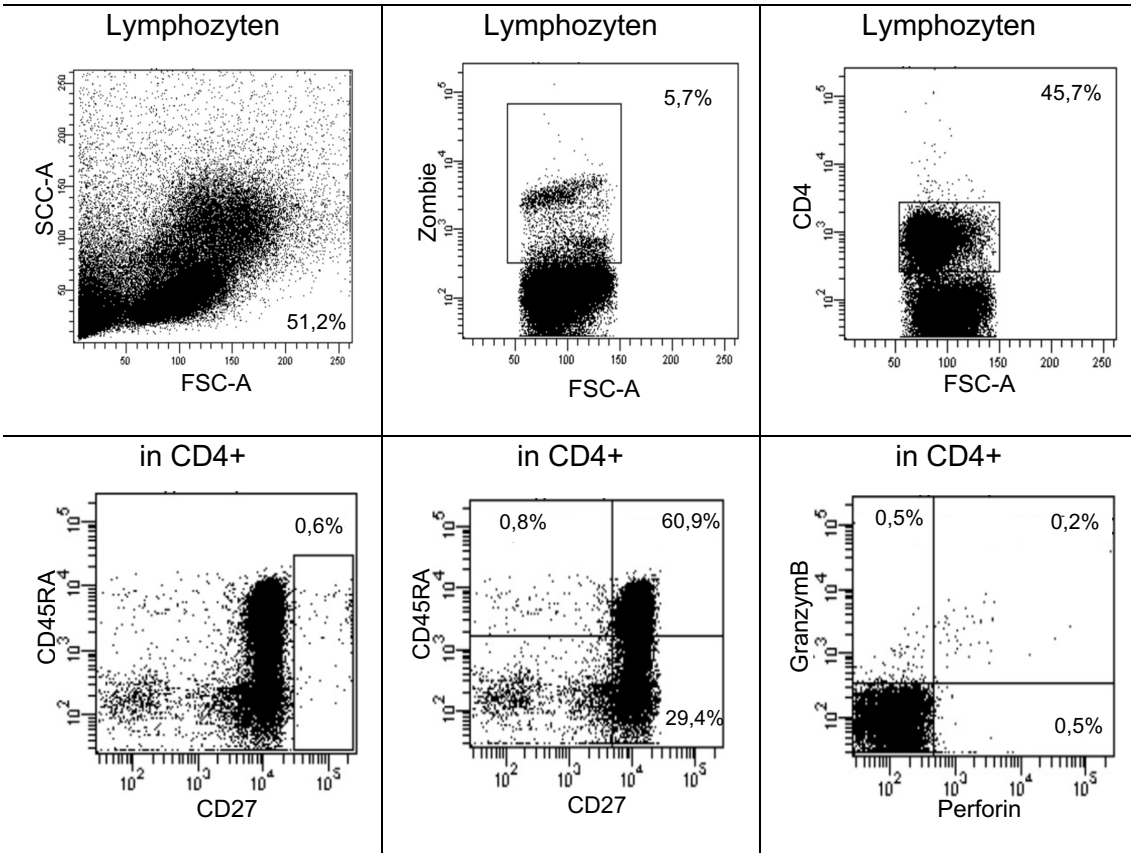
PSO – Färbung 3

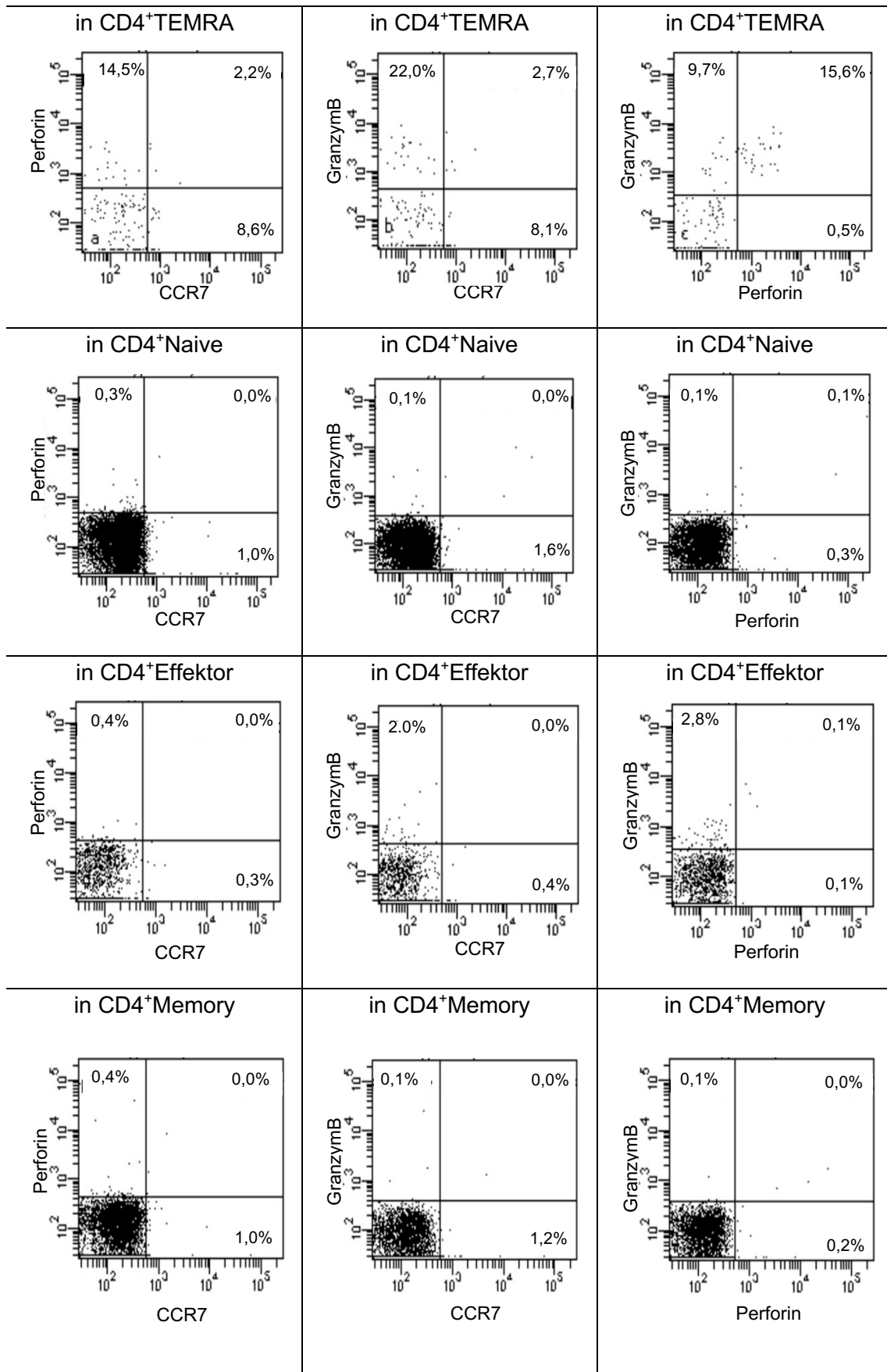


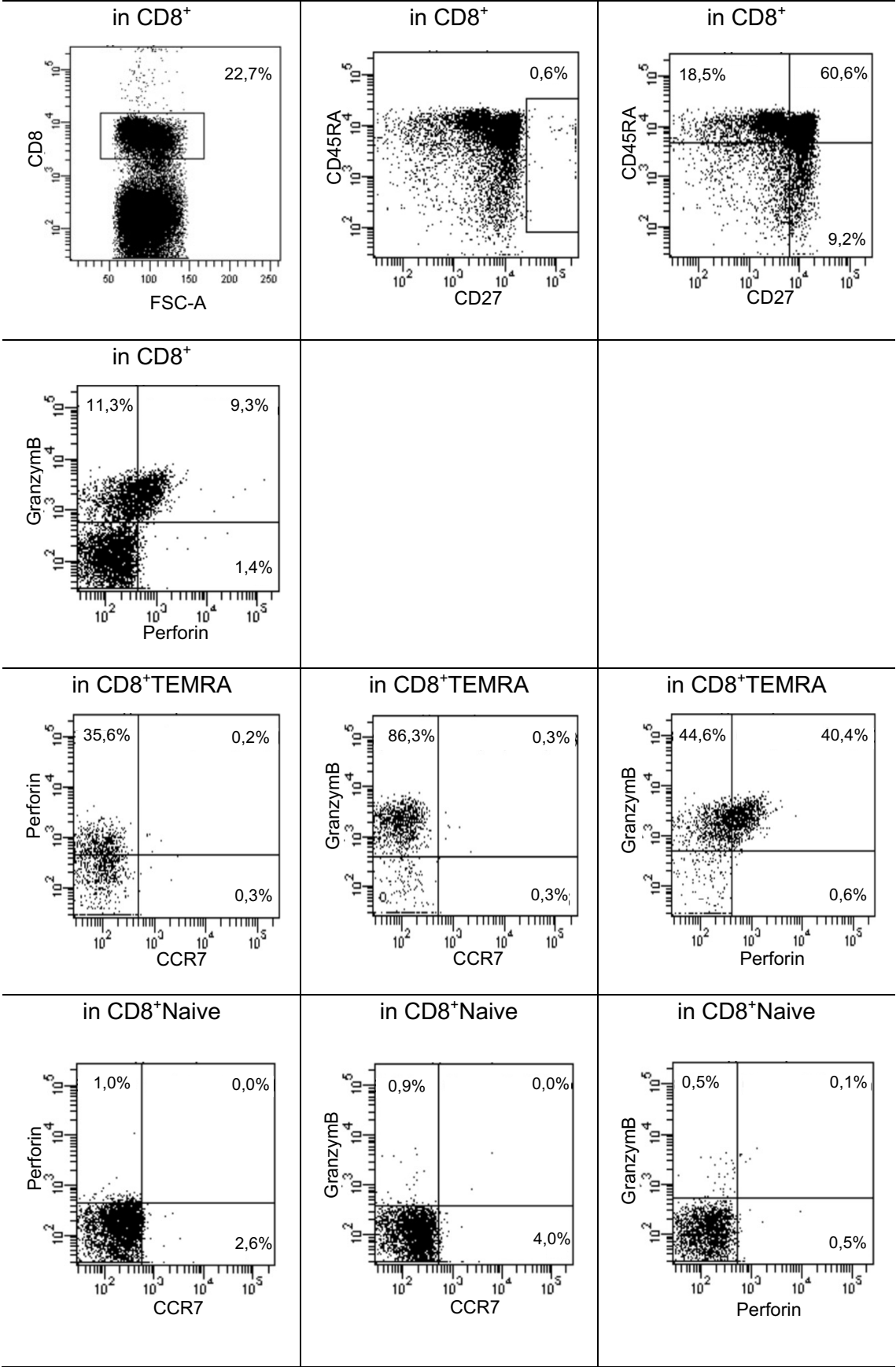


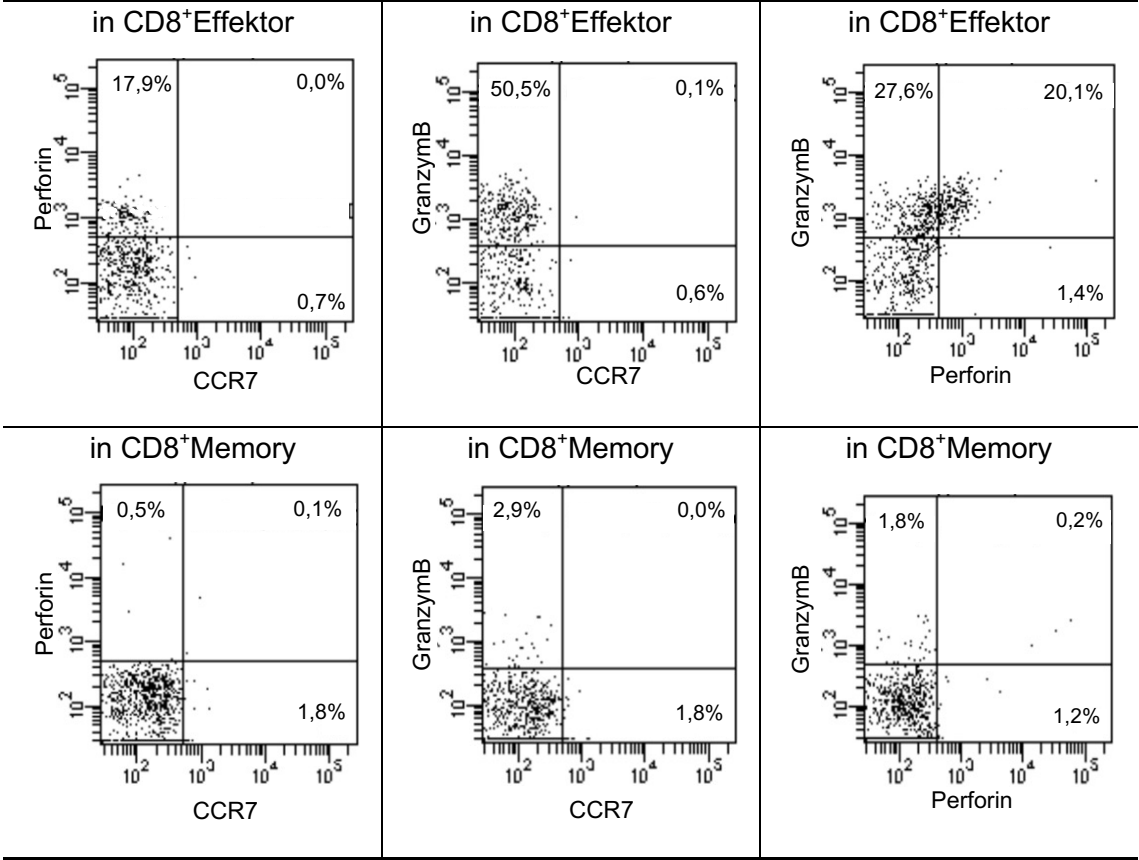


HC – Färbung 4

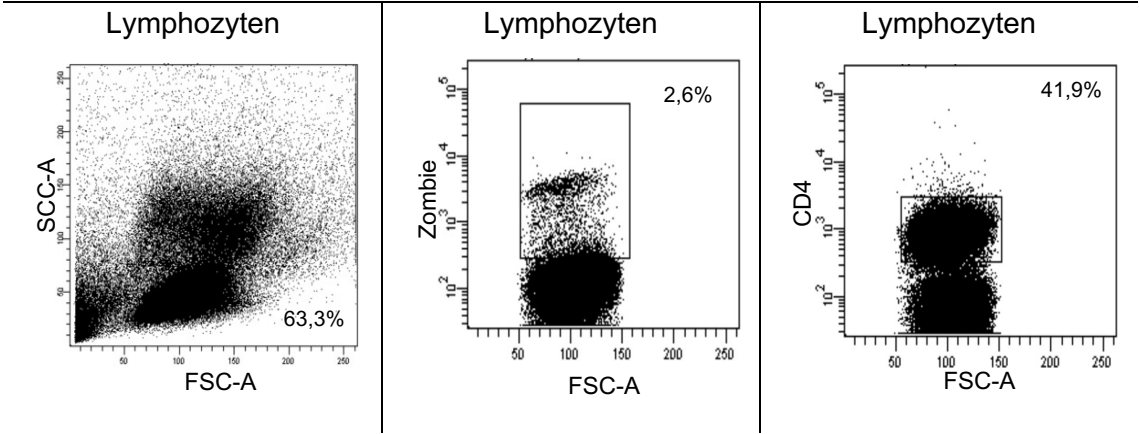


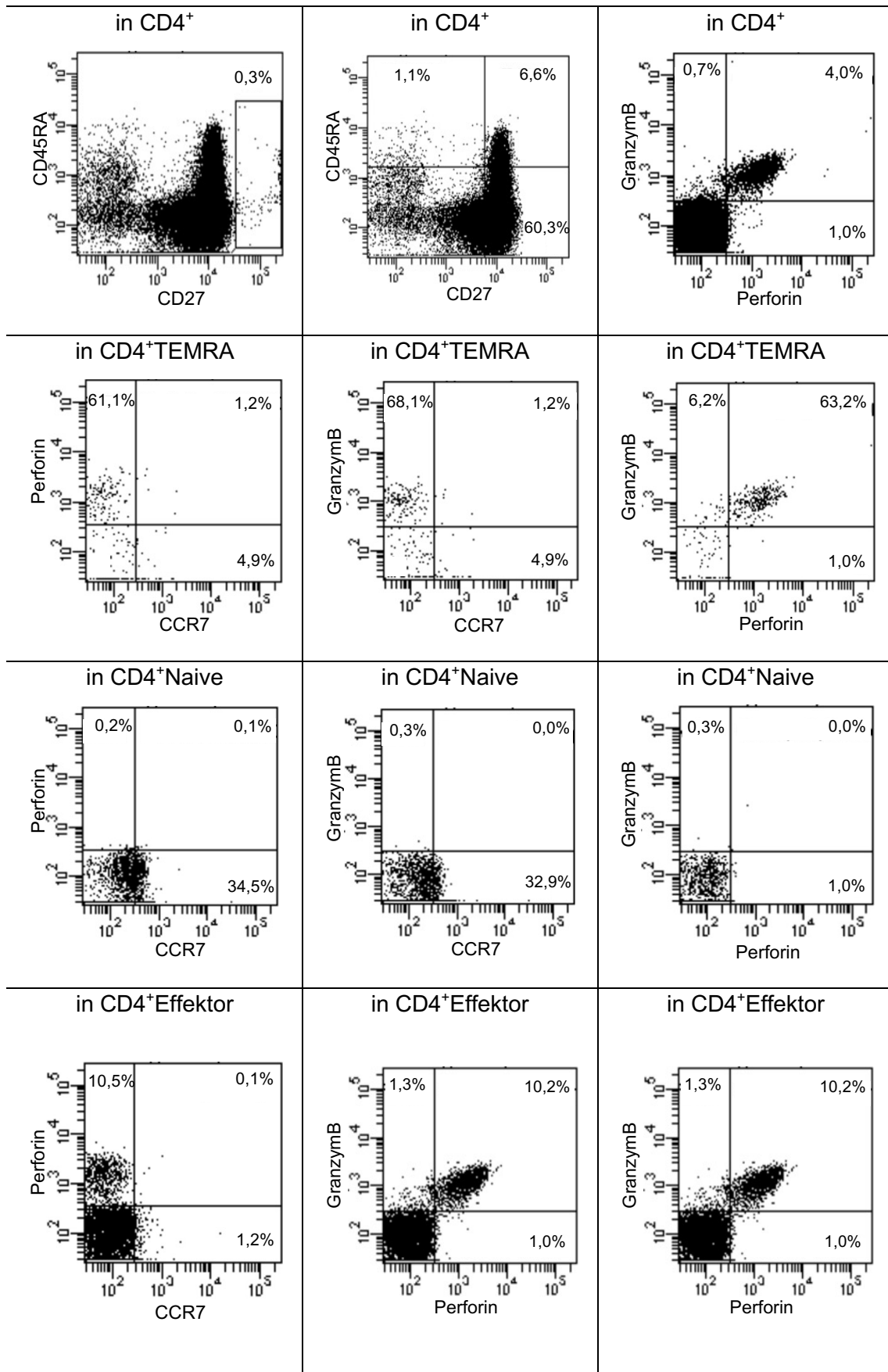


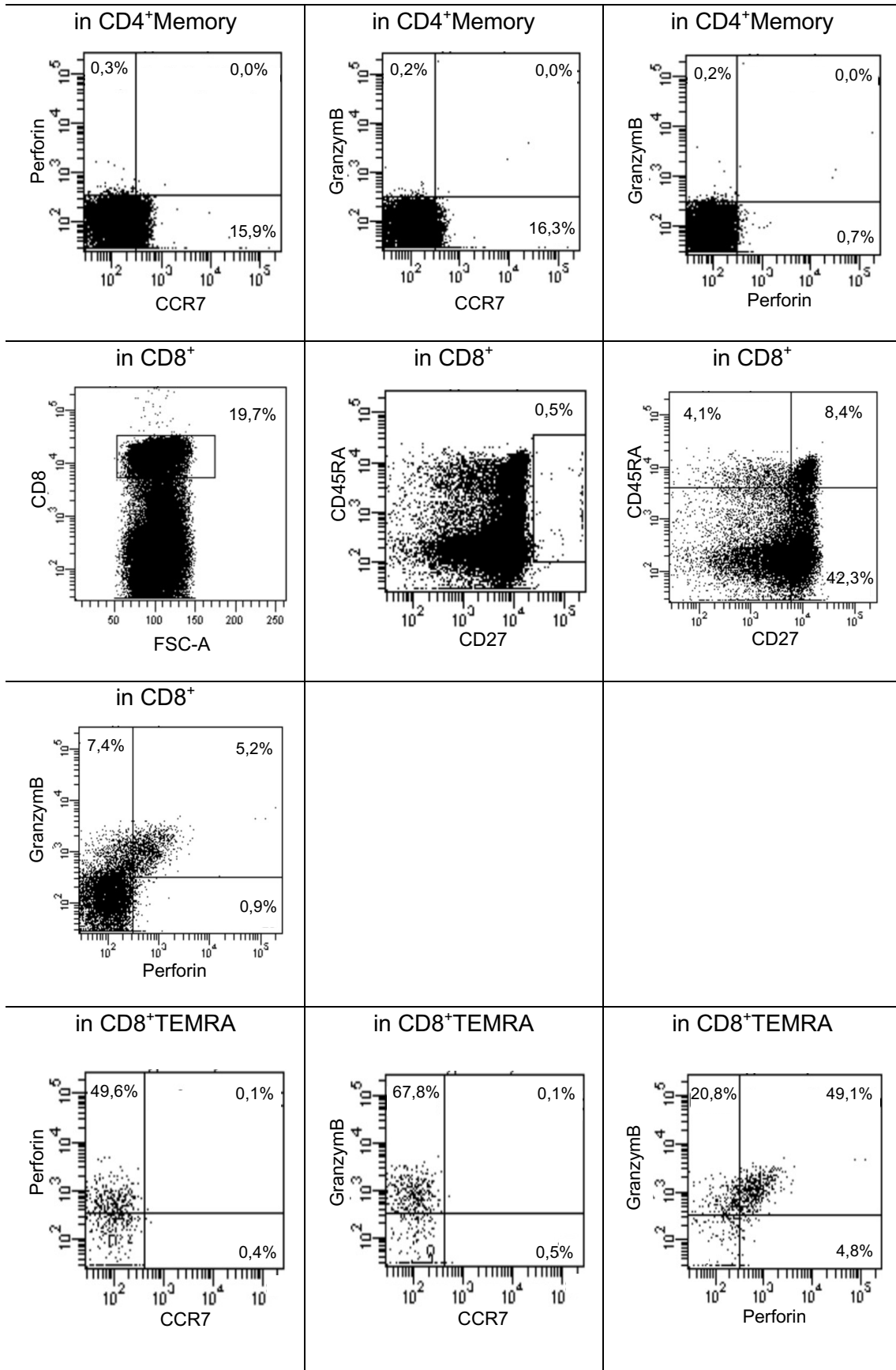


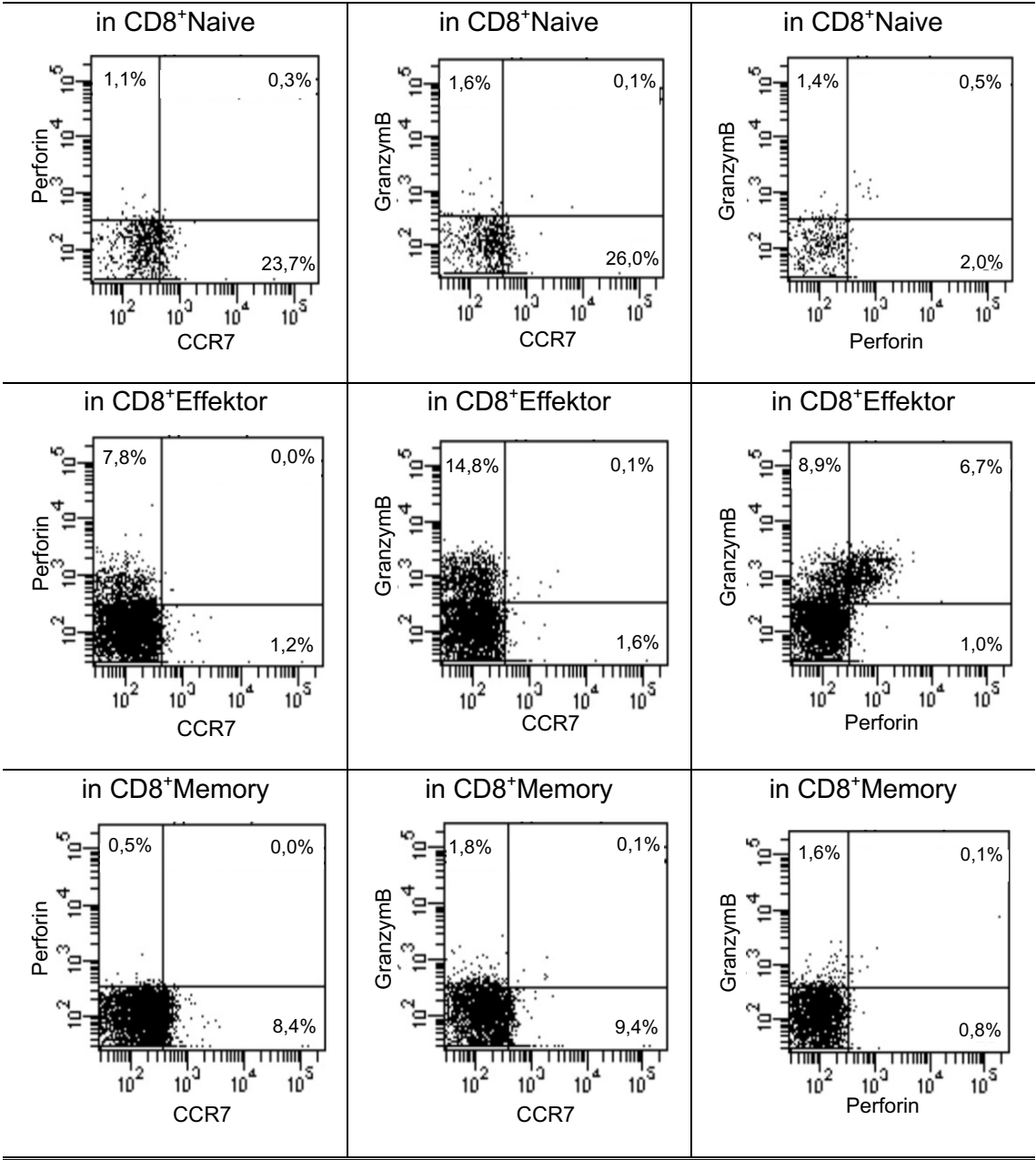


PSO – Färbung 4

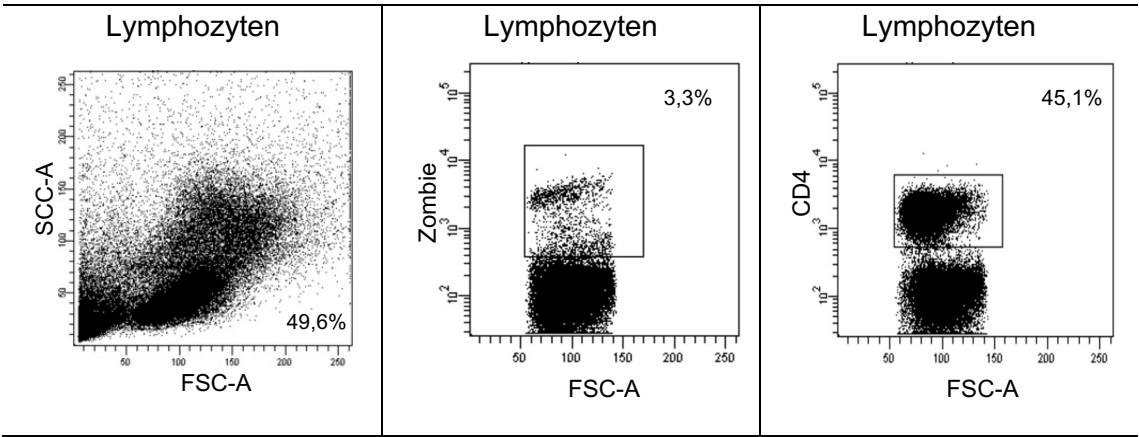


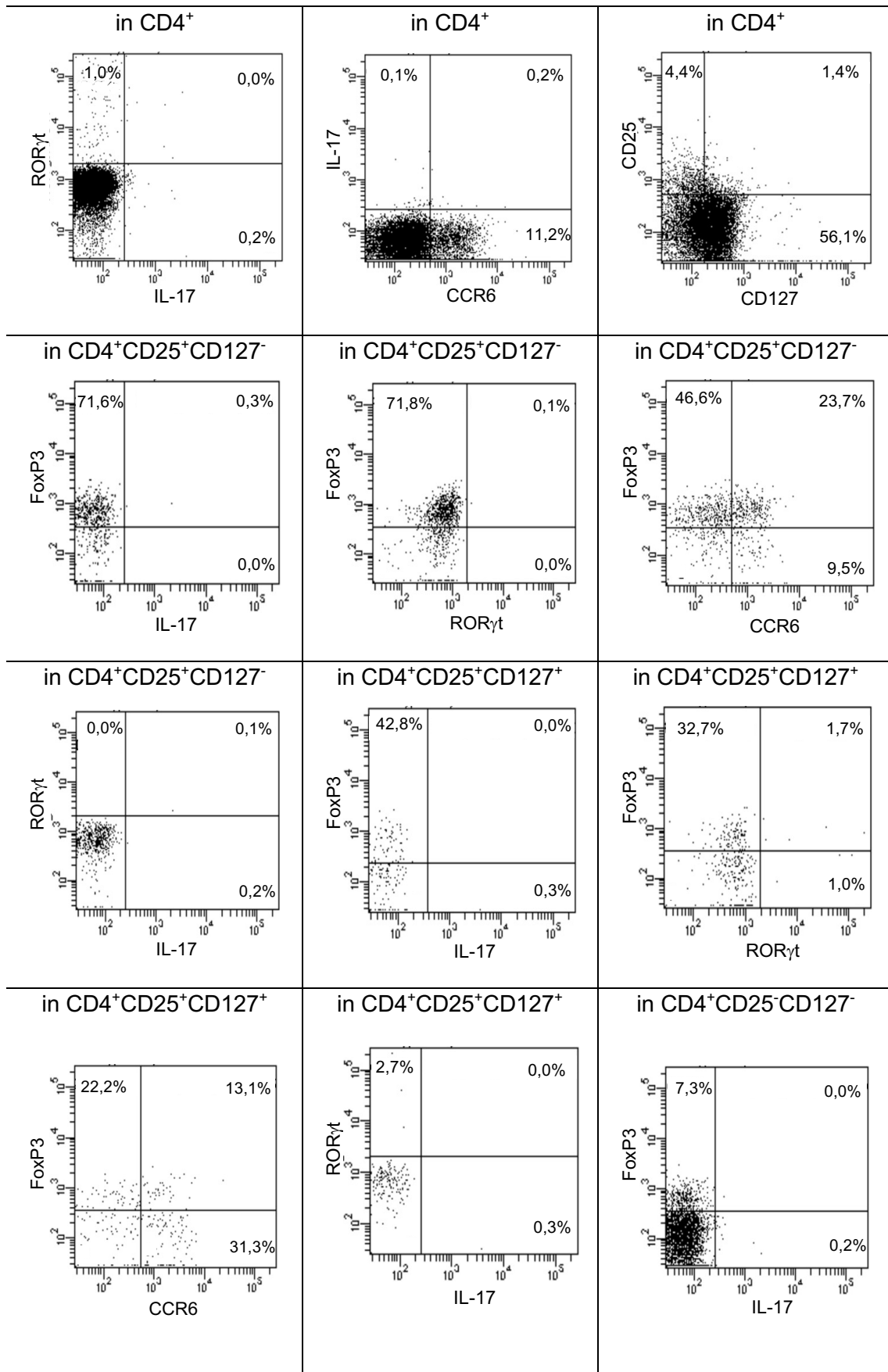


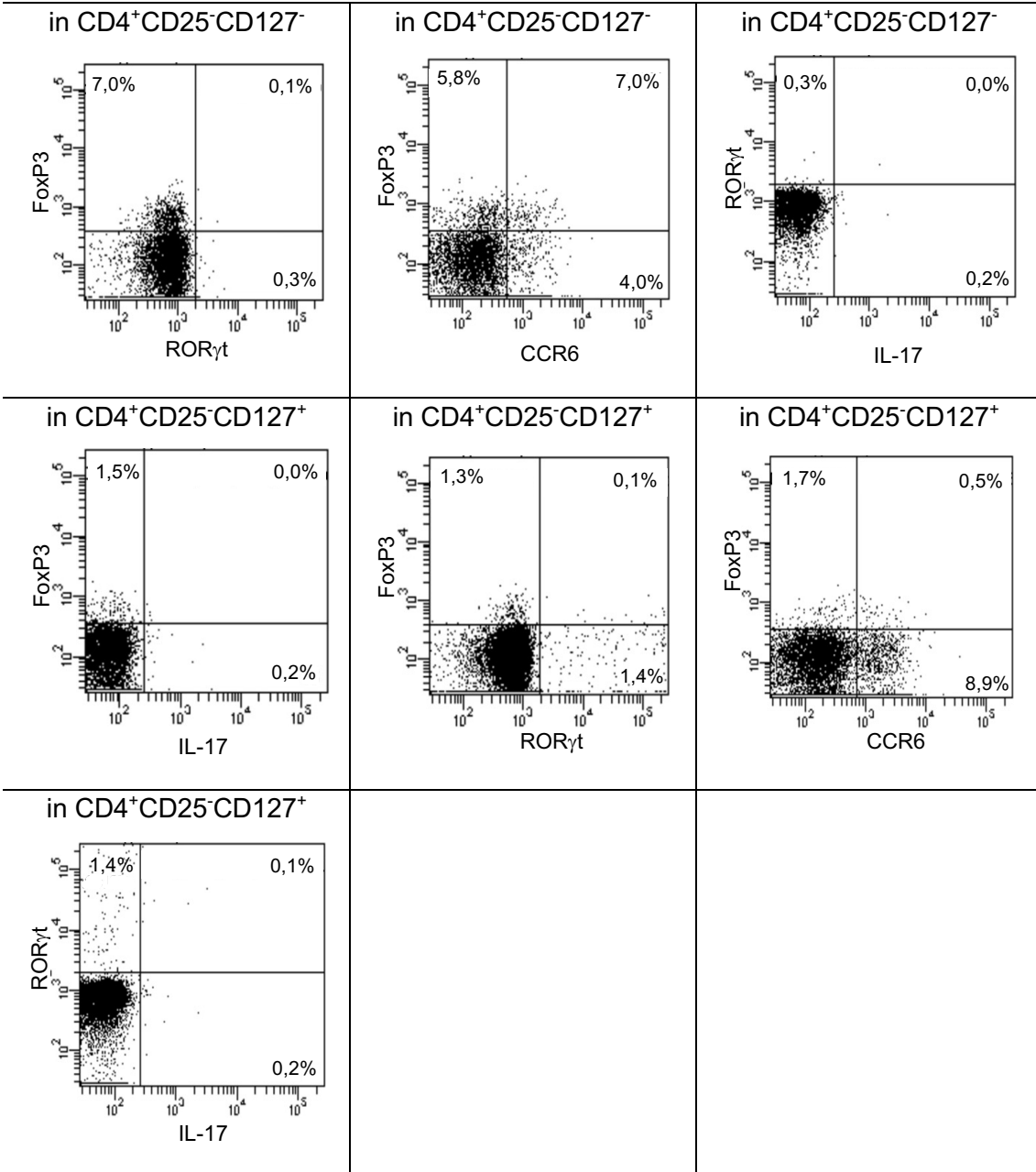




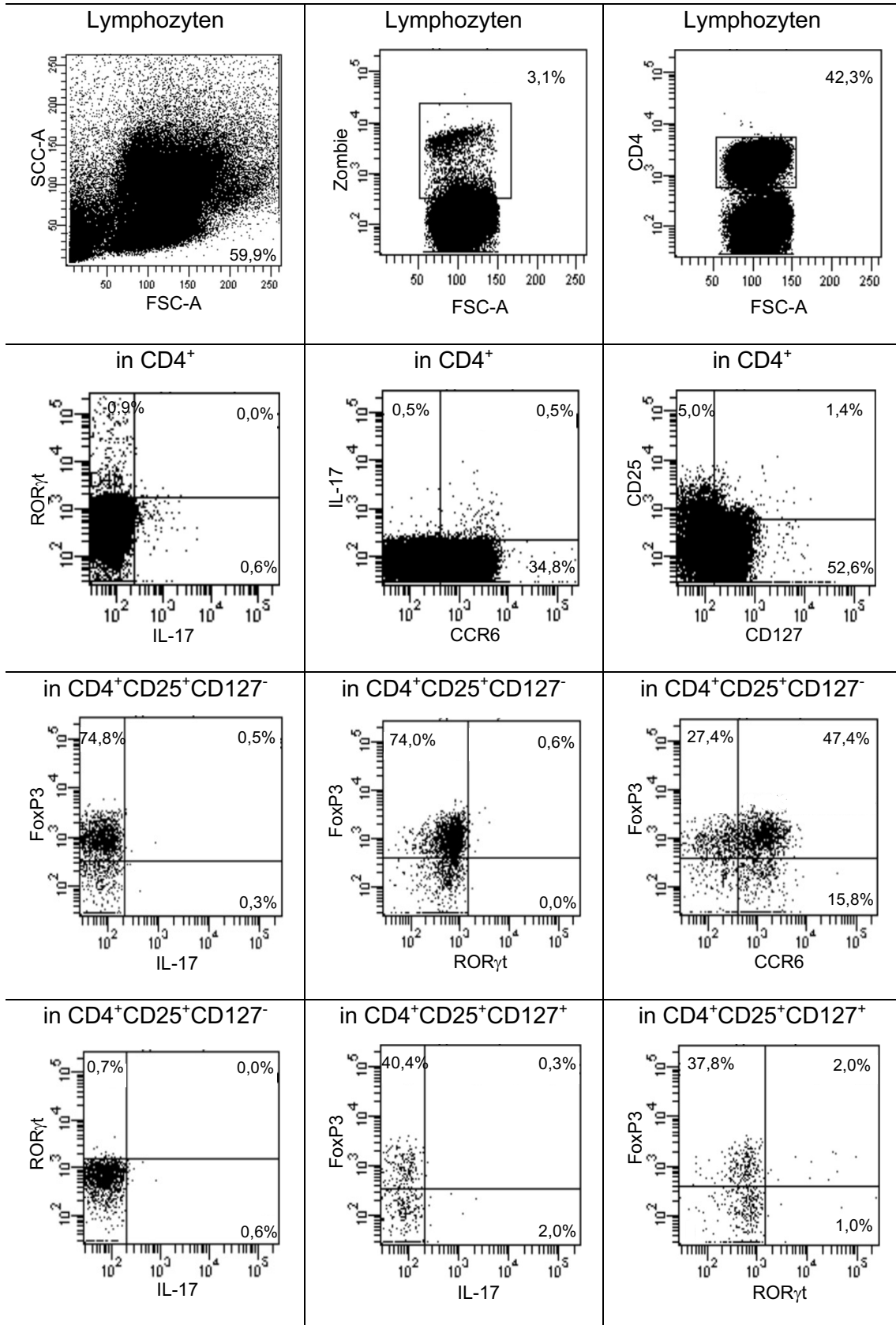
HC – Färbung5

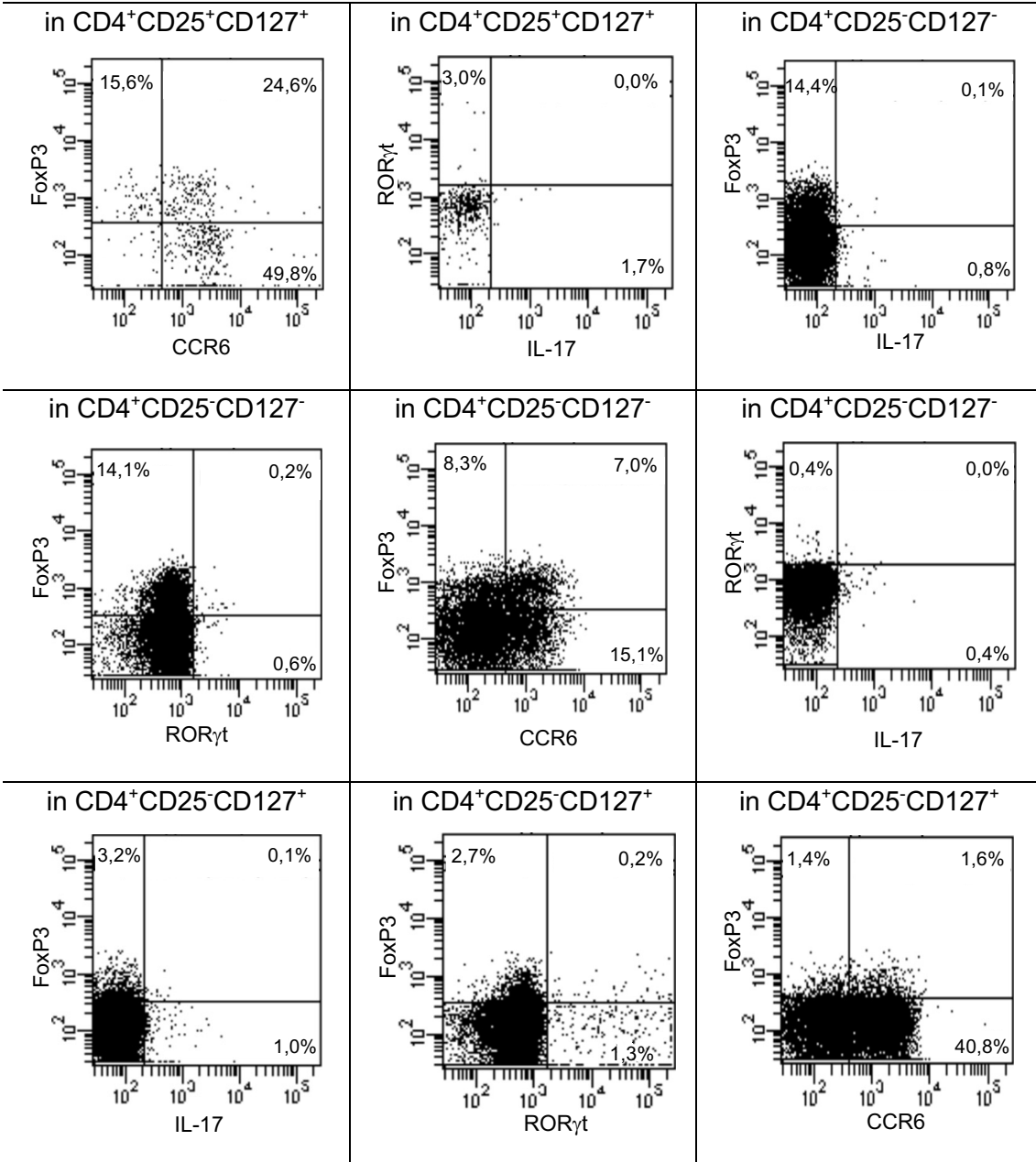






PSO – Tube5





in CD4⁺CD25⁻CD127⁺

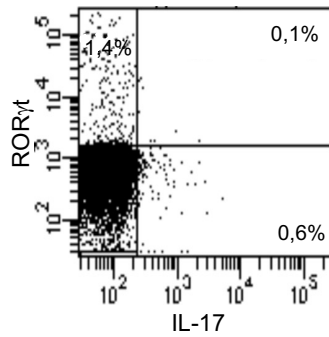
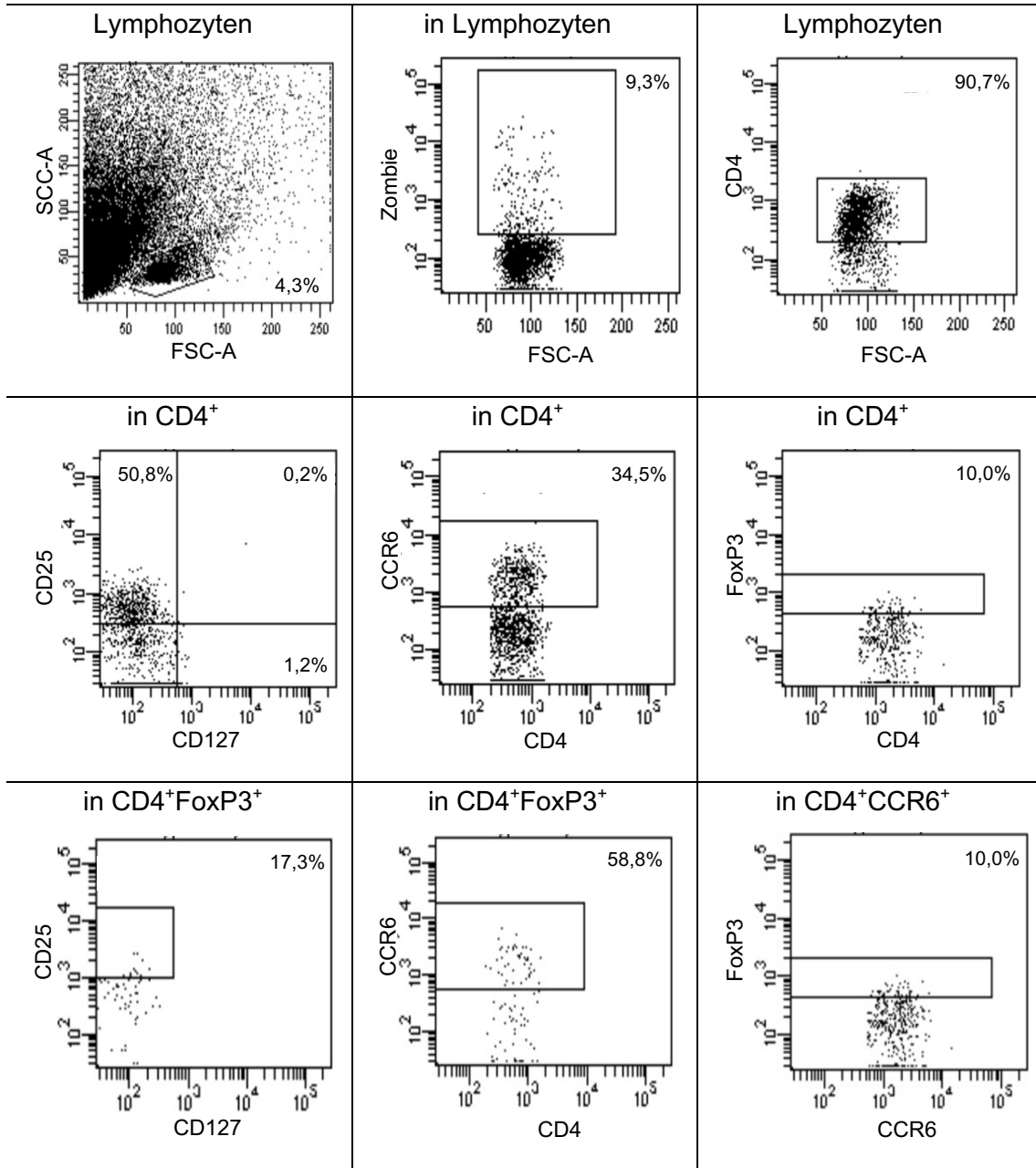
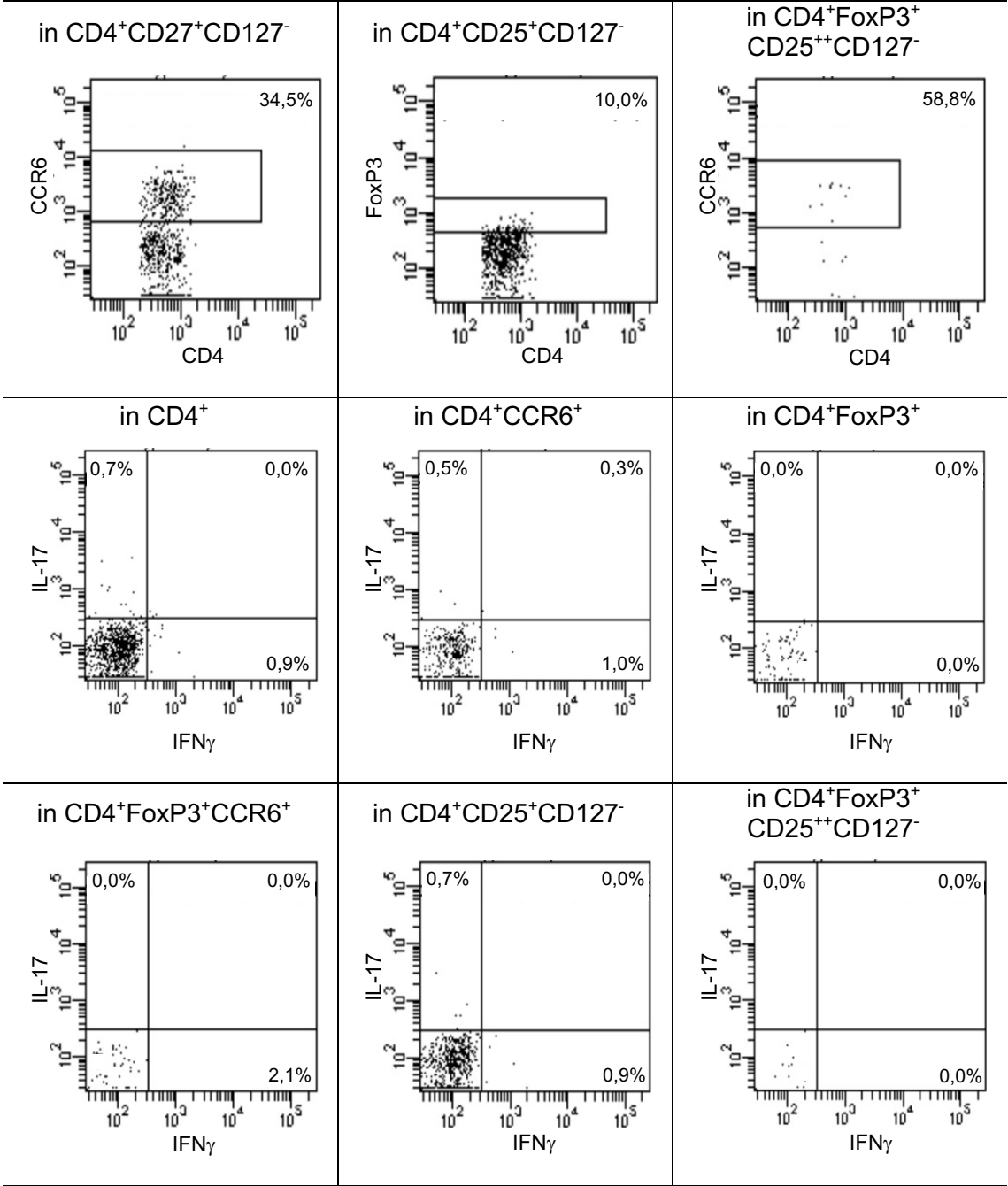


Abbildung 50: Repräsentative Dot Blots der PBMC-Charakterisierung.

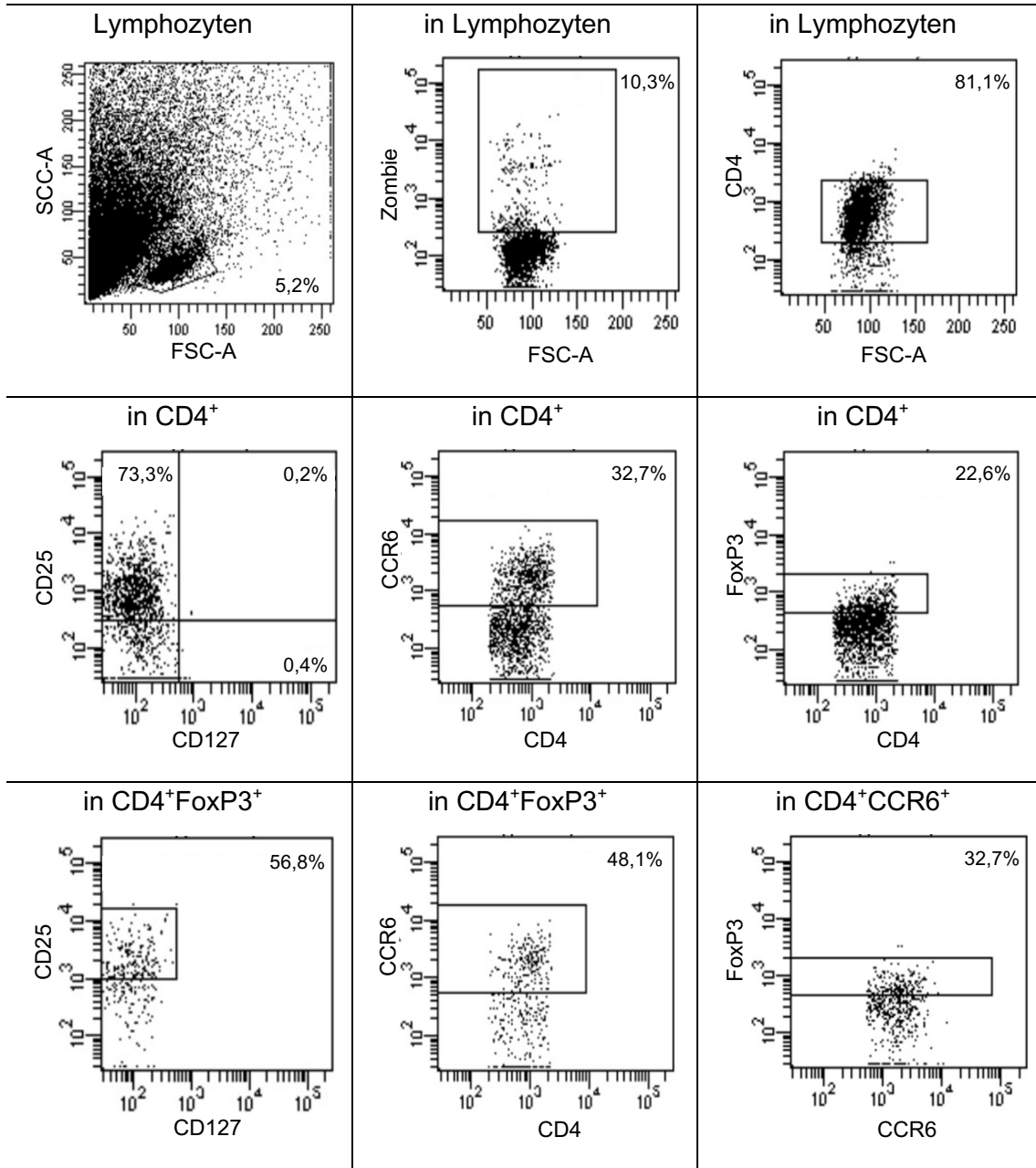
Dargestellt sind die Gating-Strategie der PBMC-Charakterisierung als Dot-Blots für die einzelnen Färbungen bei jeweils einer repräsentativen Probe für PSO und HC. Oberhalb der Abbildung findet sich die Population, in welcher gemessen wurde. Auf der X-Achse und der Y-Achse ist die jeweilige Messgröße aufgezeichnet. Prozentangaben finden sich in den jeweiligen Quadranten.

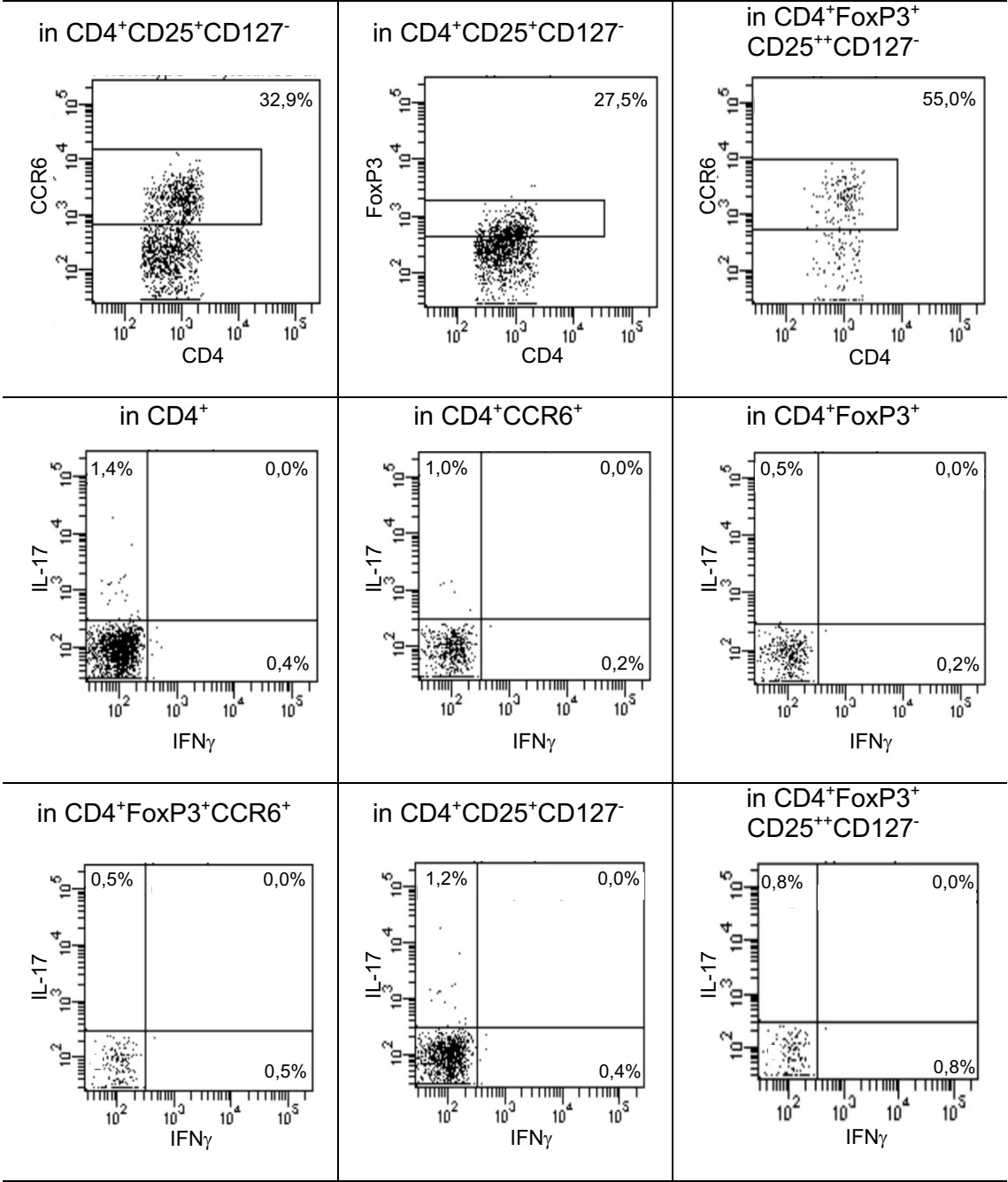
Unstimuliert - HC



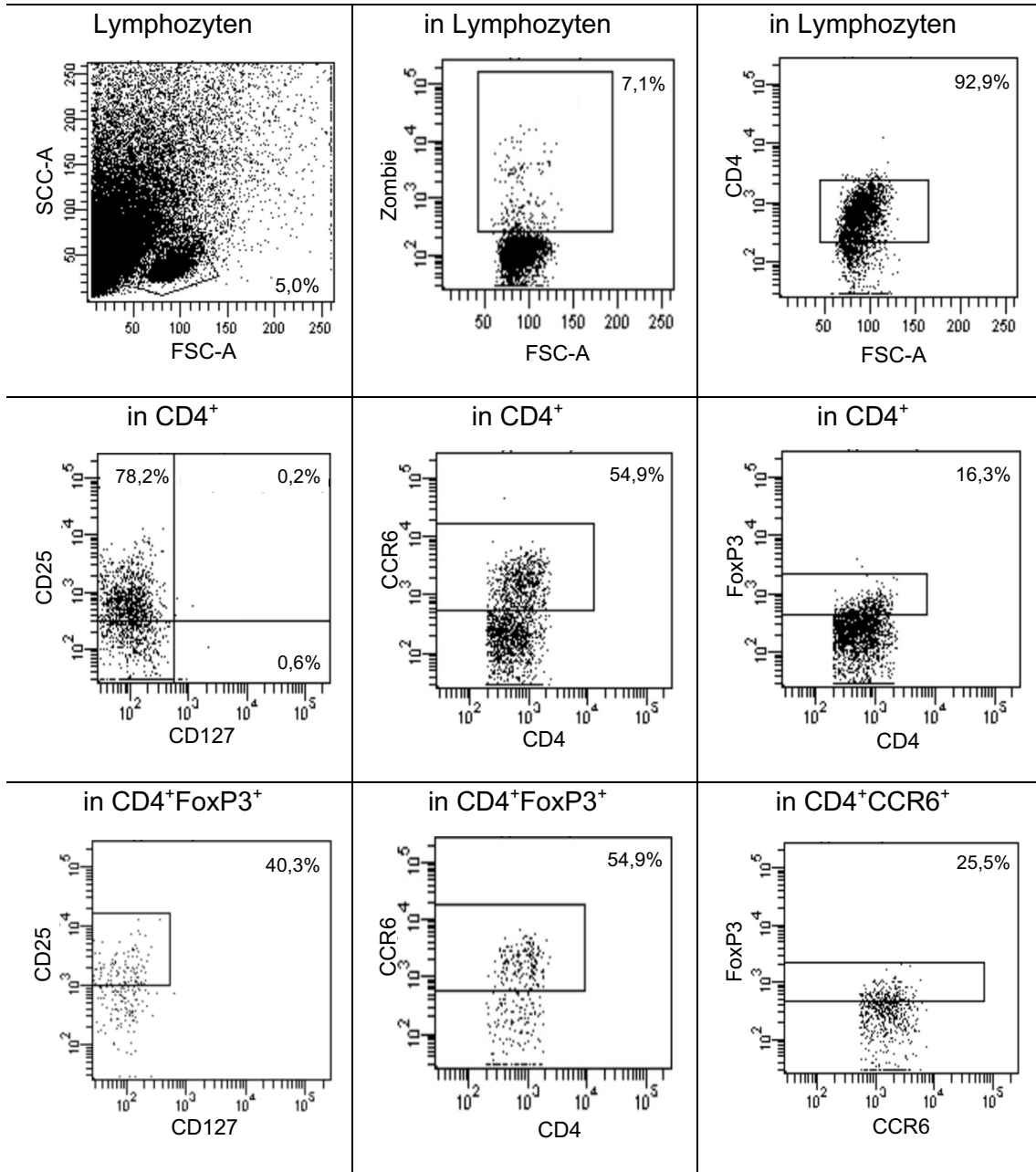


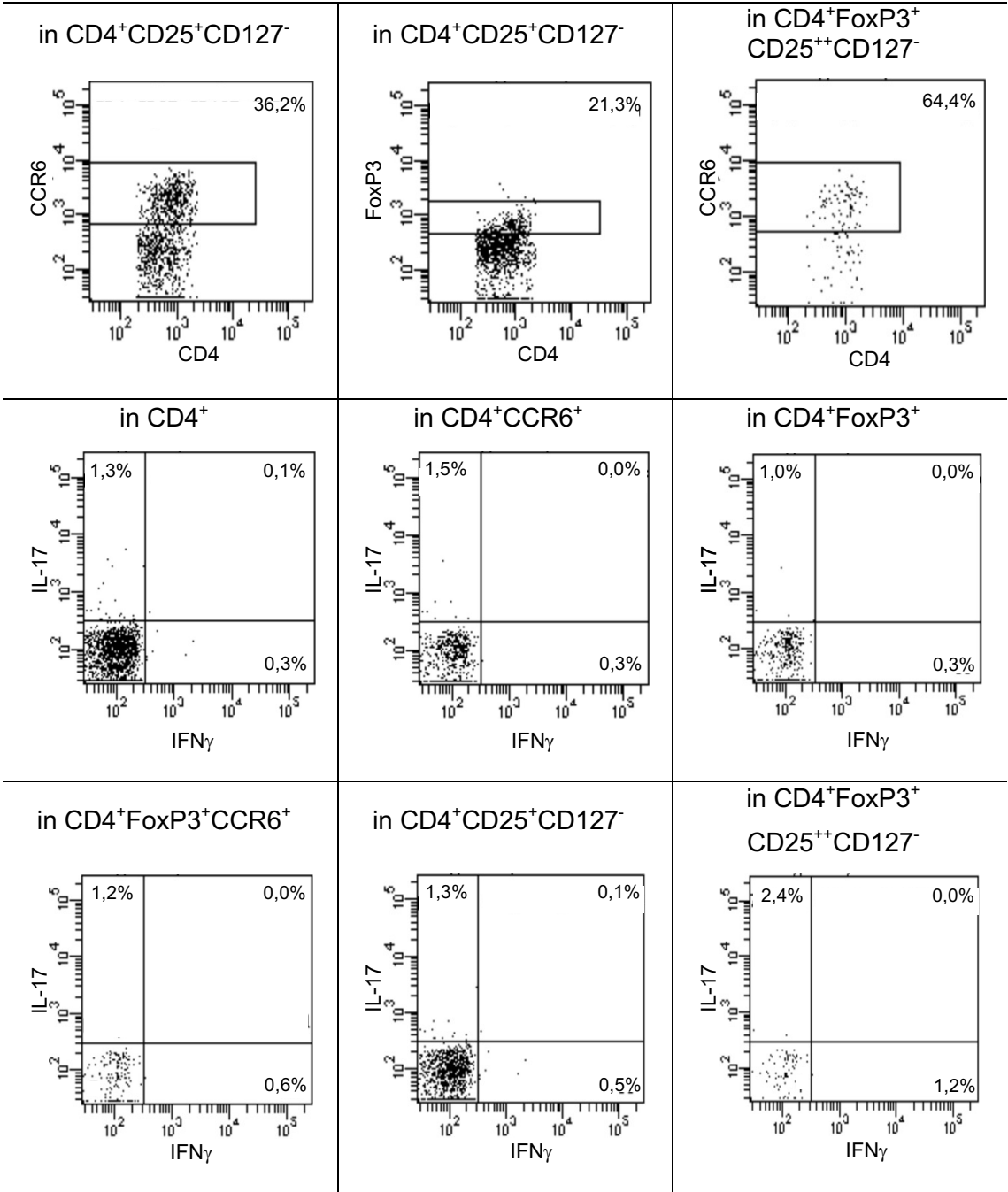
antiCD3/CD28 - HC



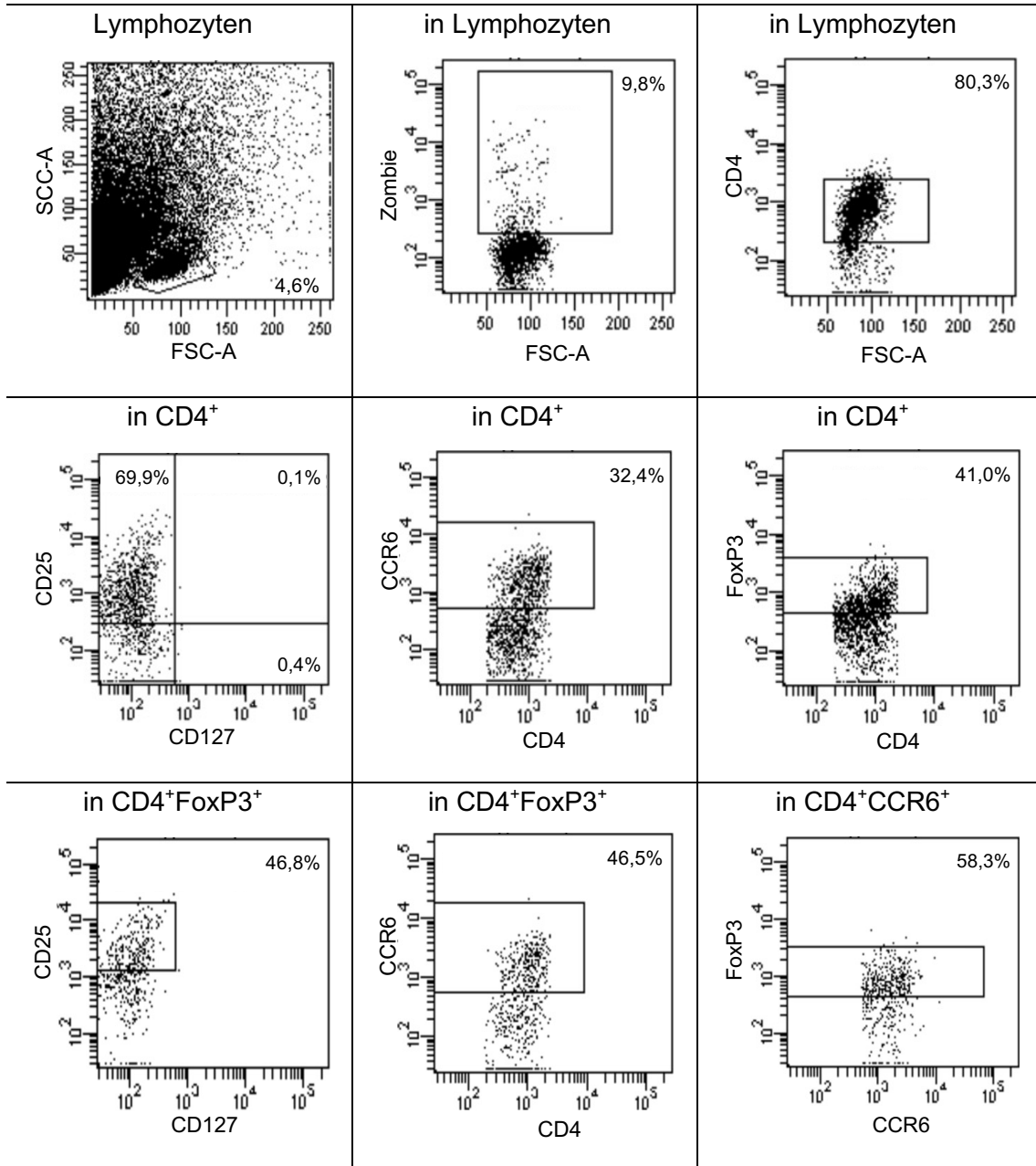


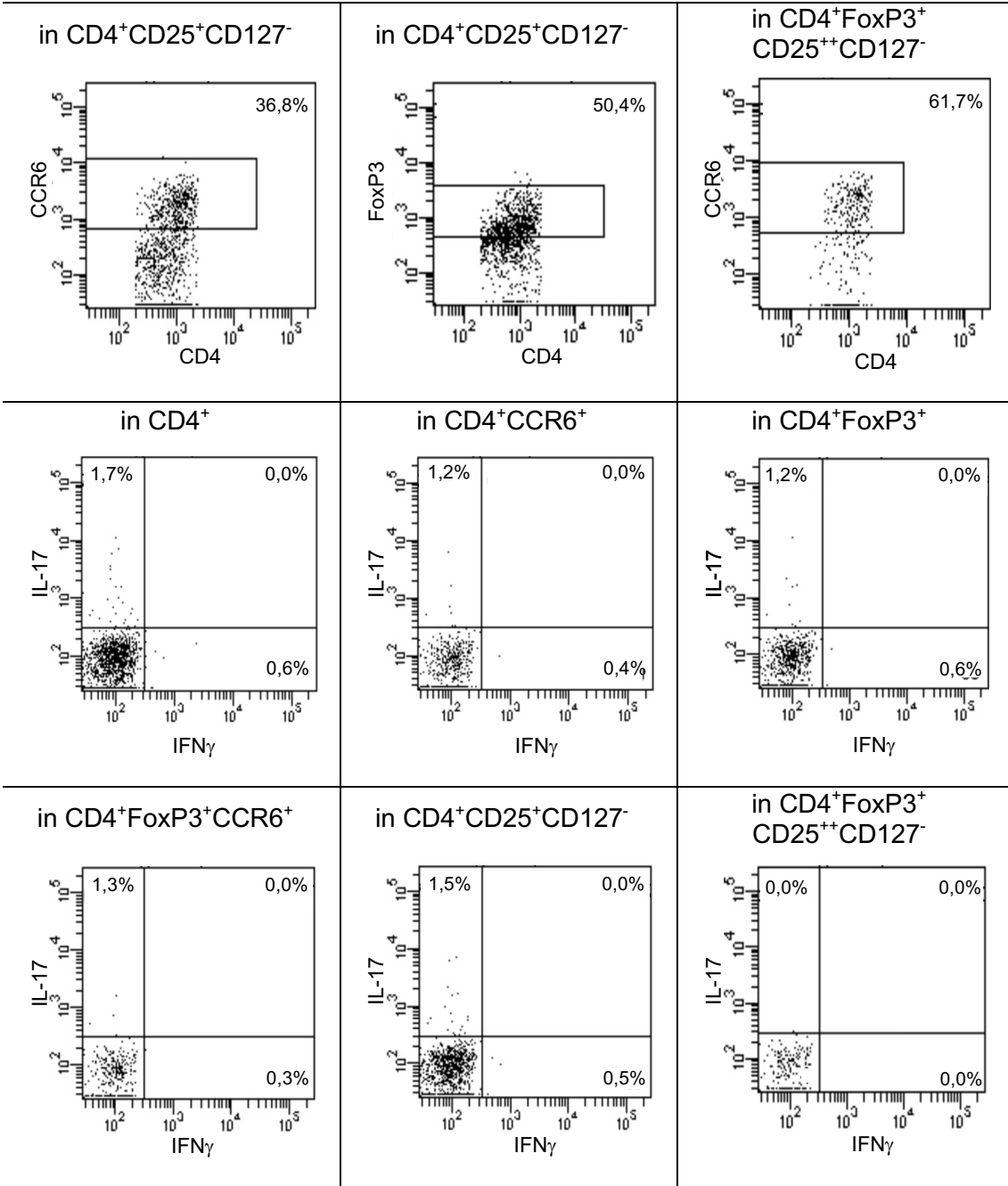
IL-17 - HC



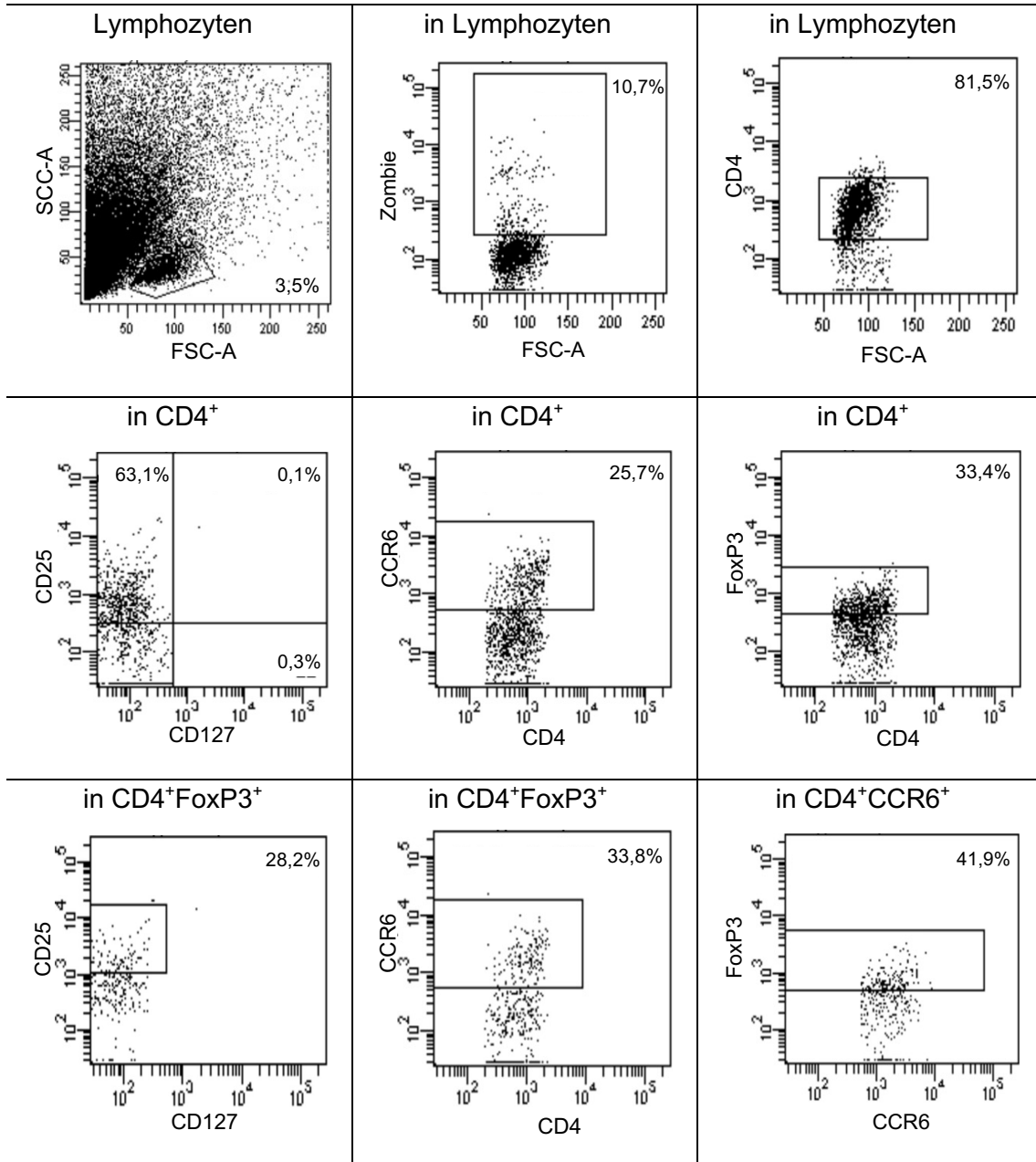


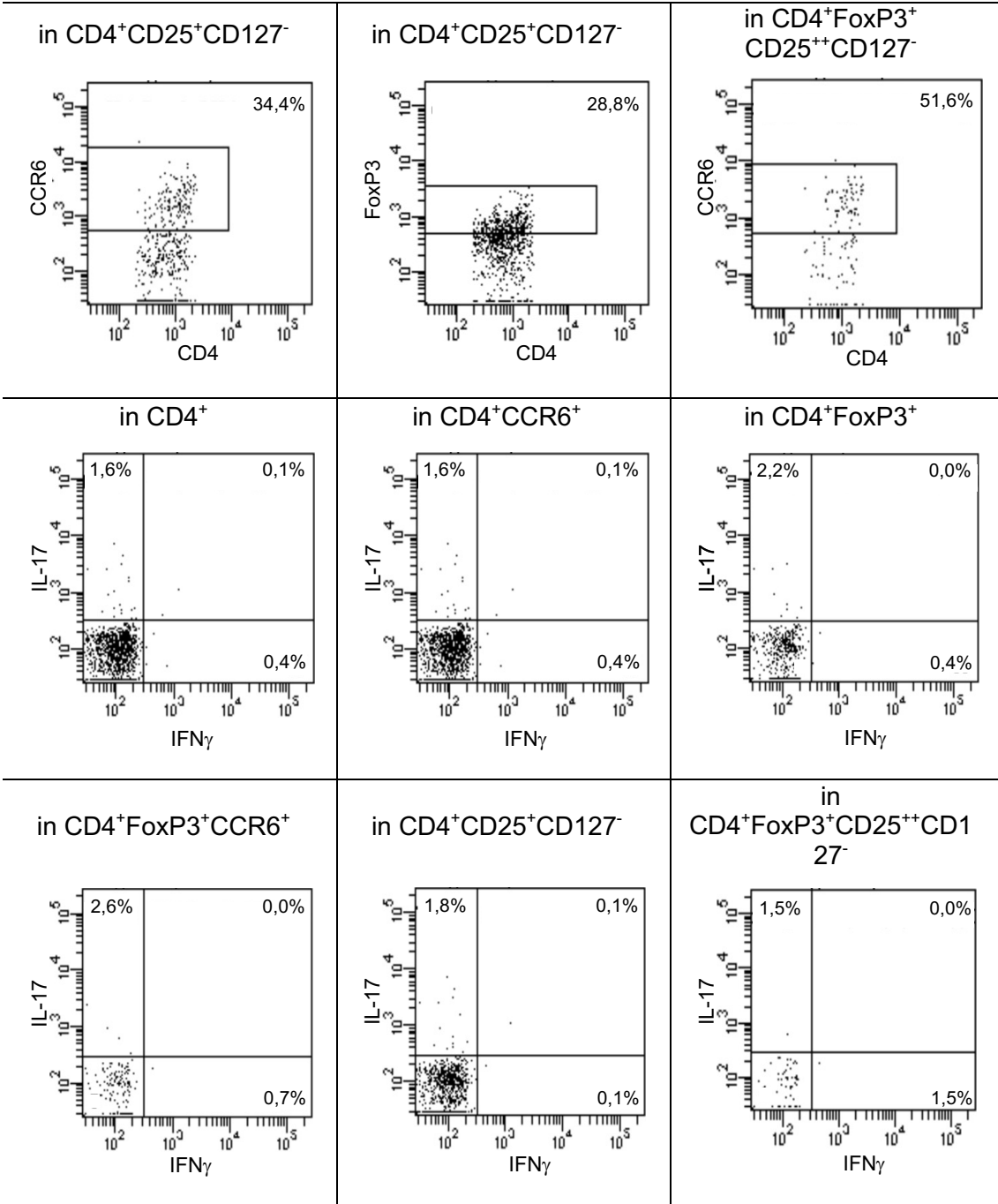
anti-IL-17 - HC



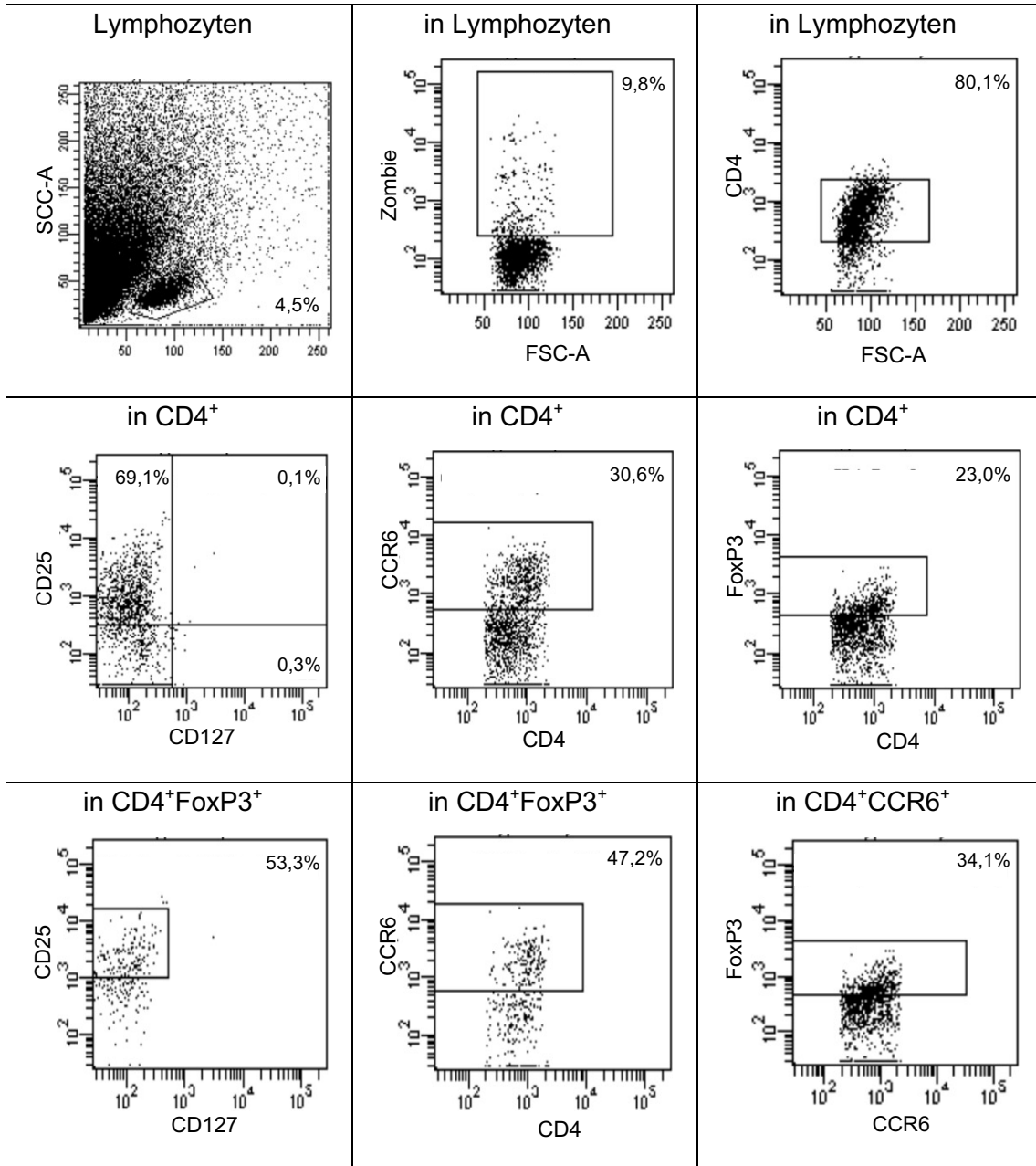


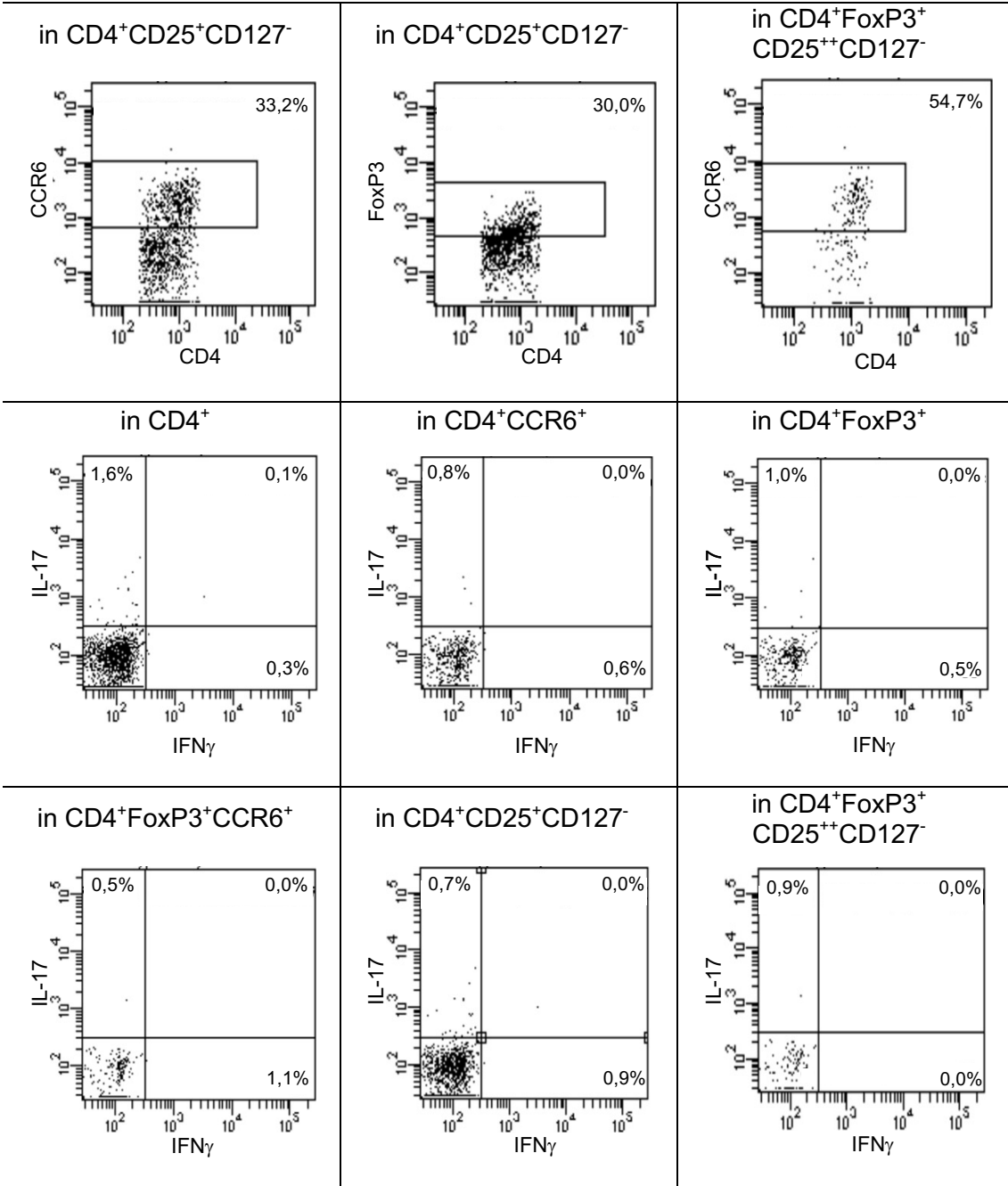
Th17 - HC



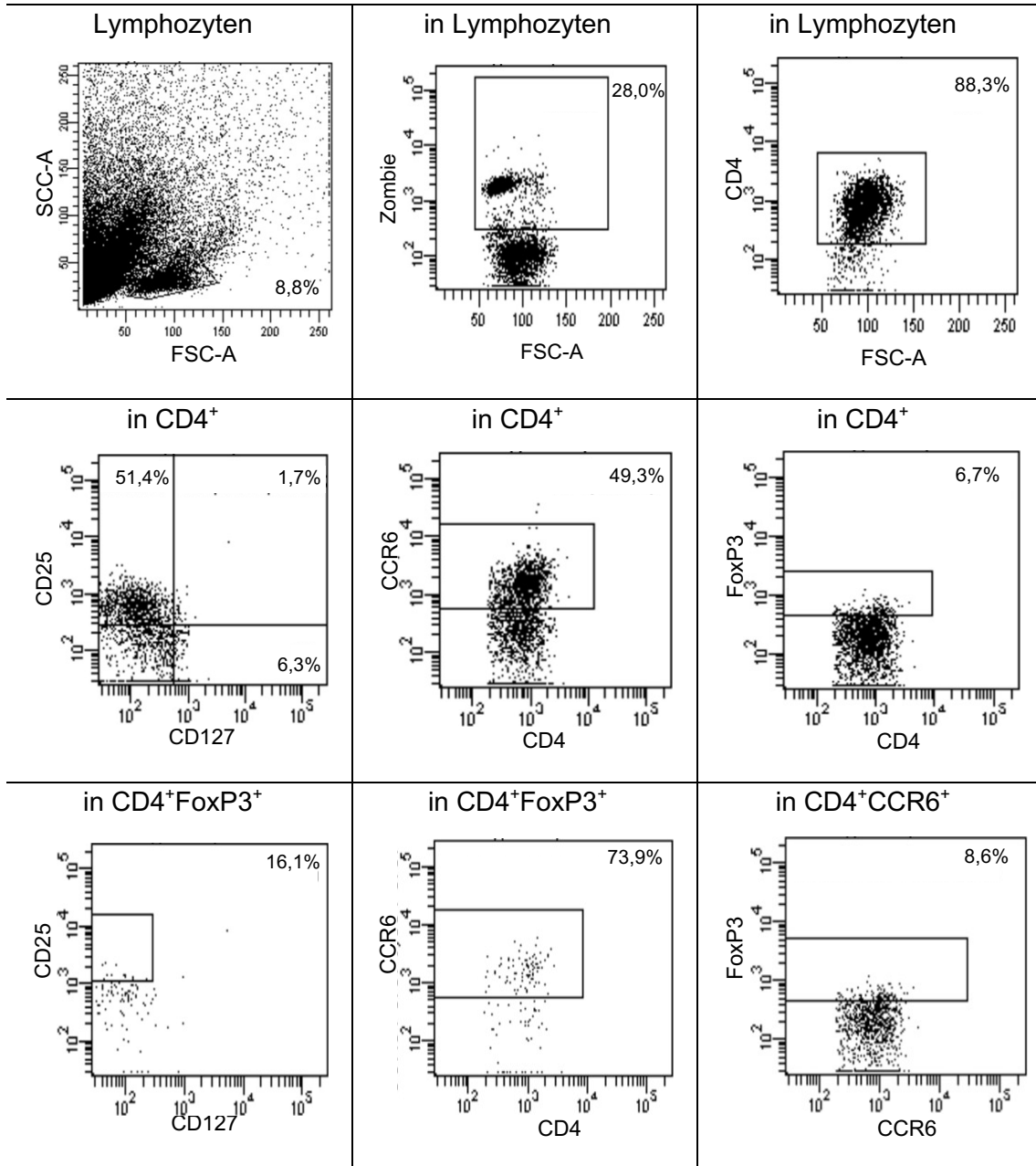


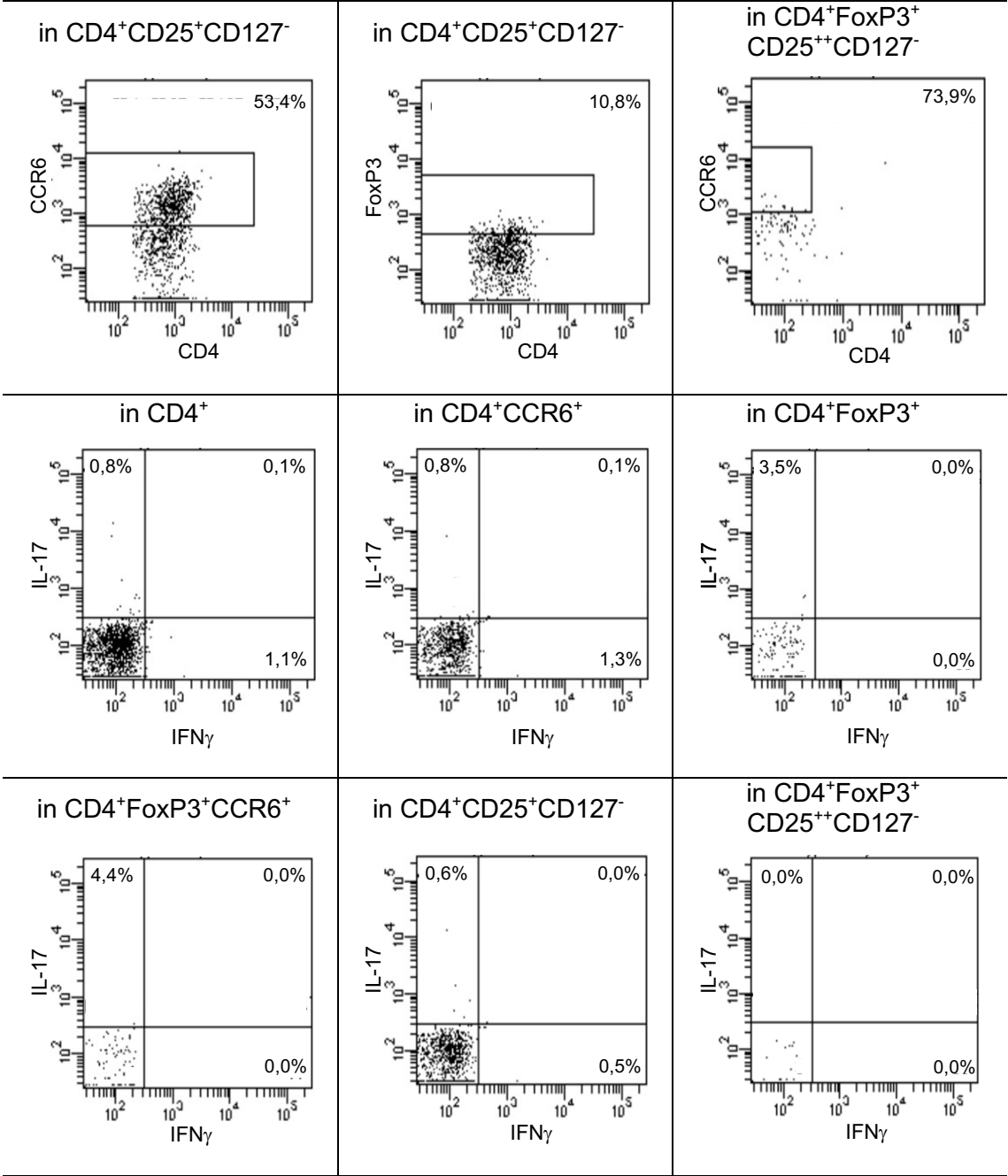
Secukinumab - HC



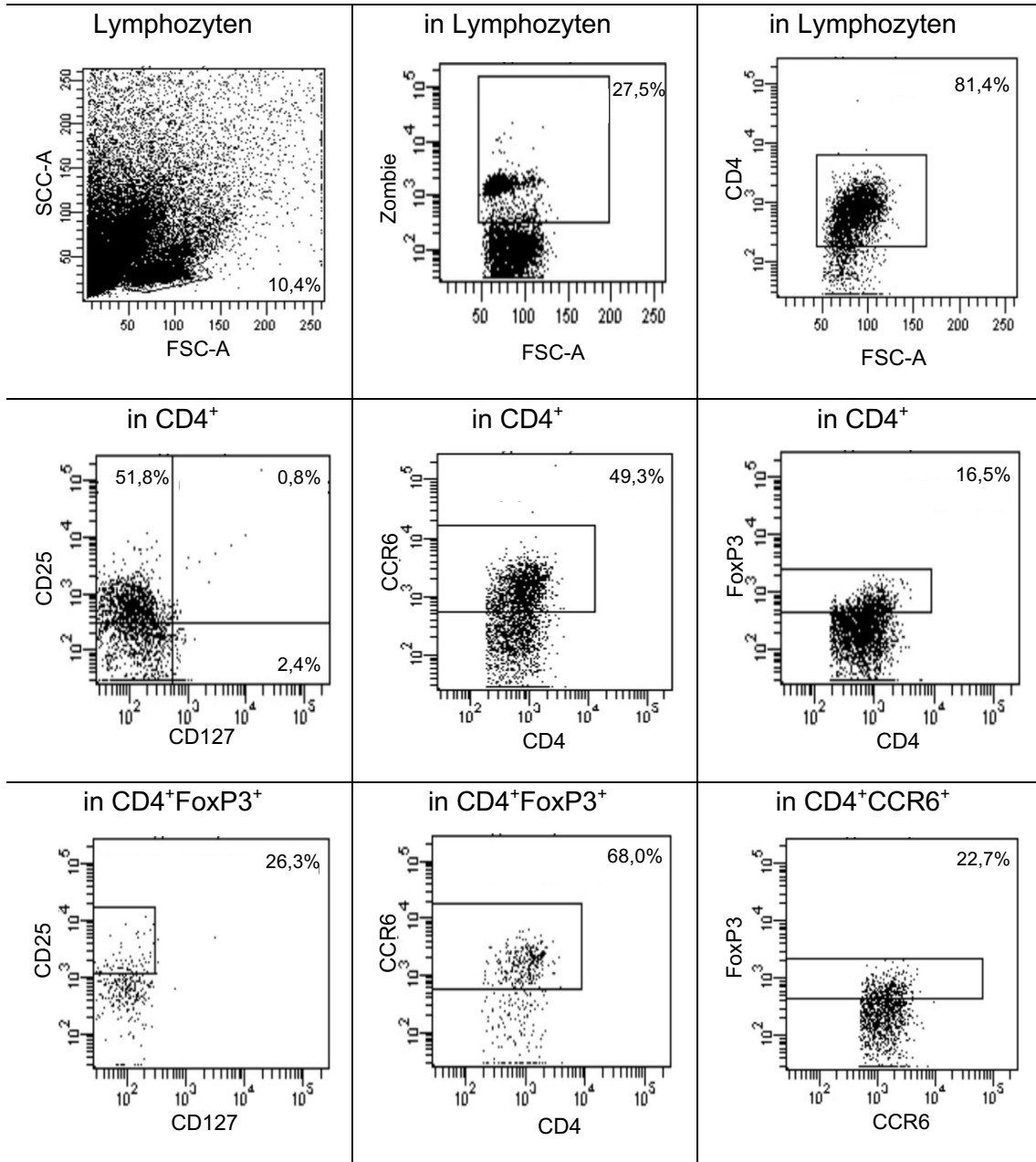


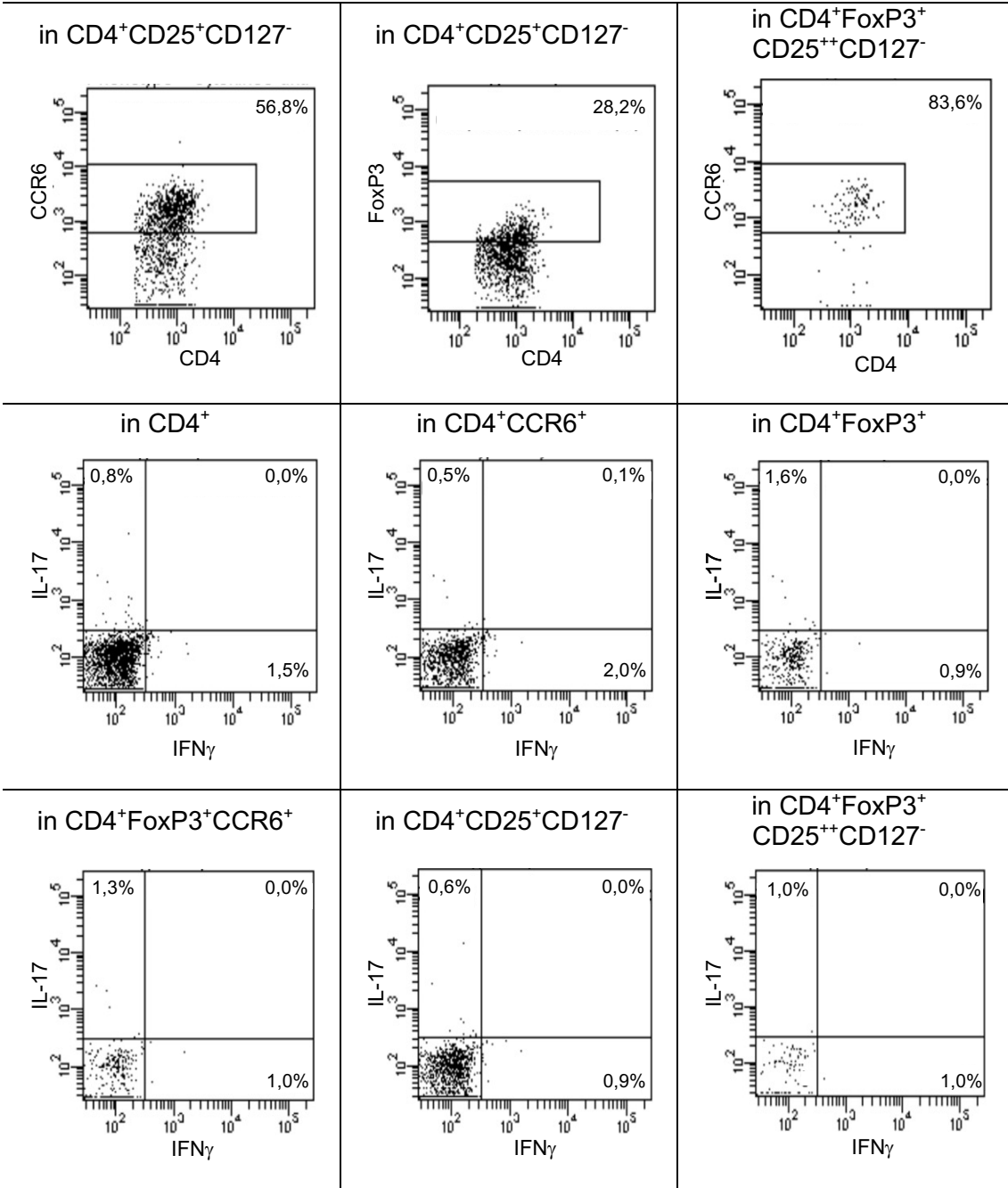
Unstimuliert - PSO



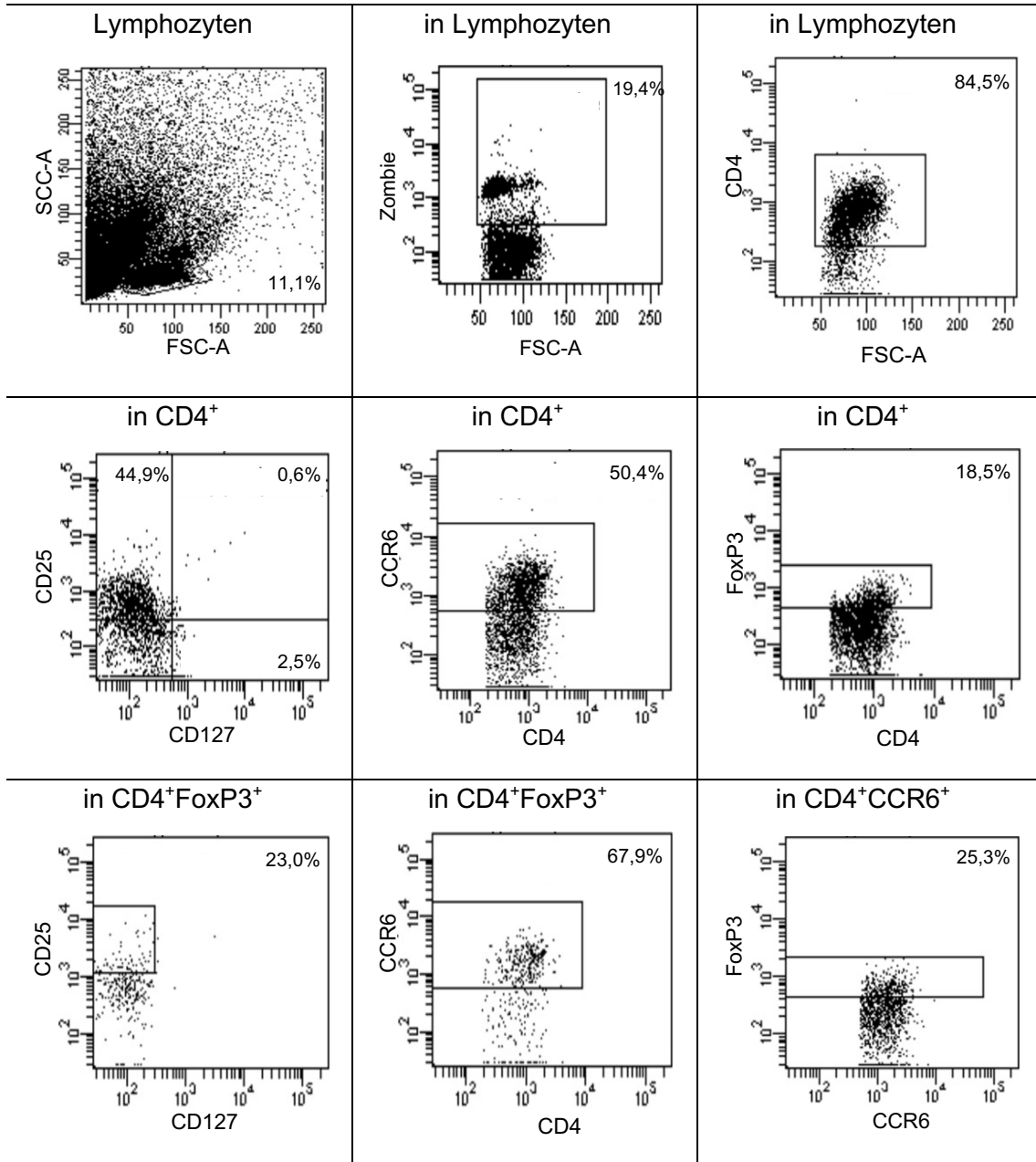


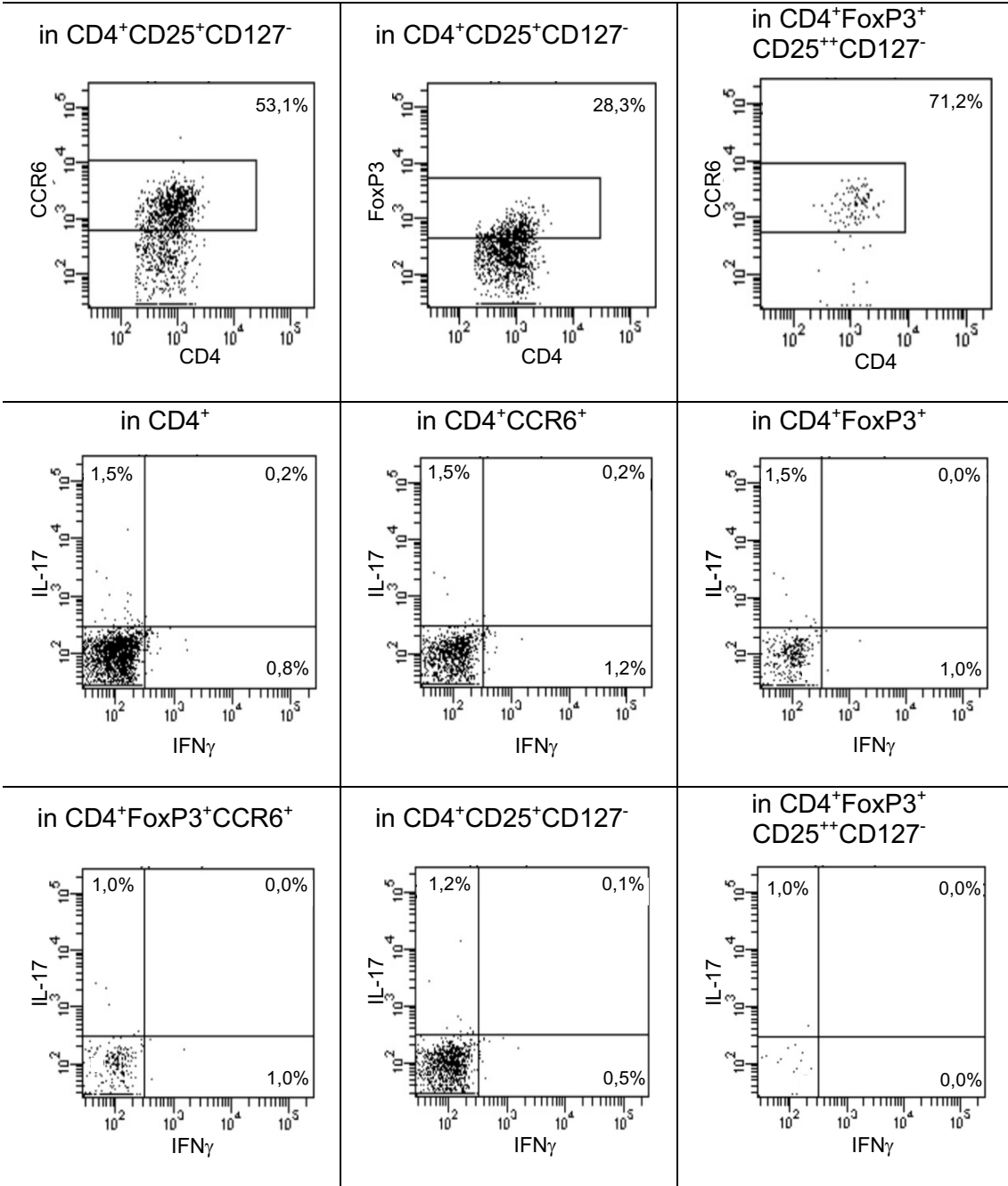
antiCD3/CD28 - PSO



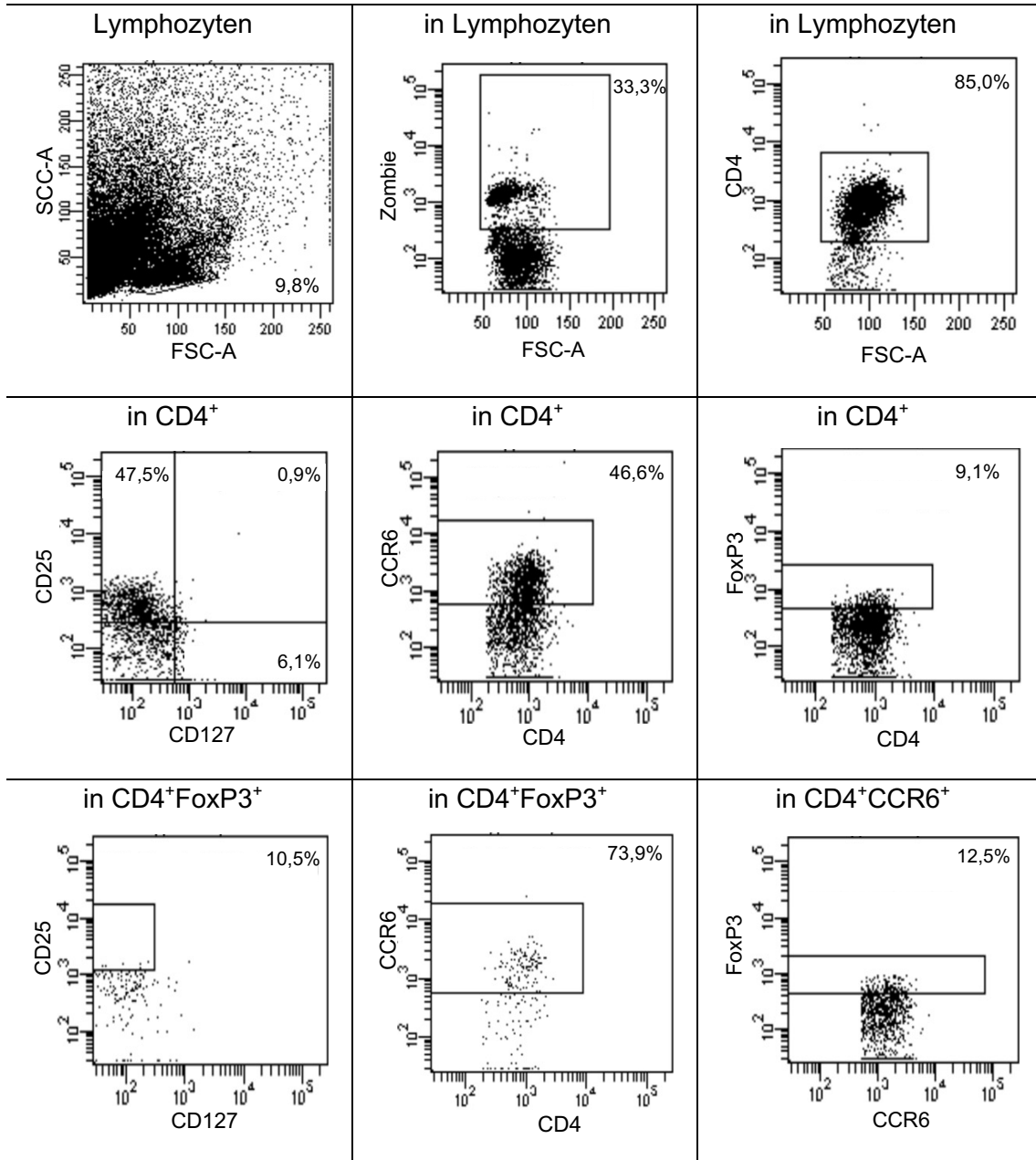


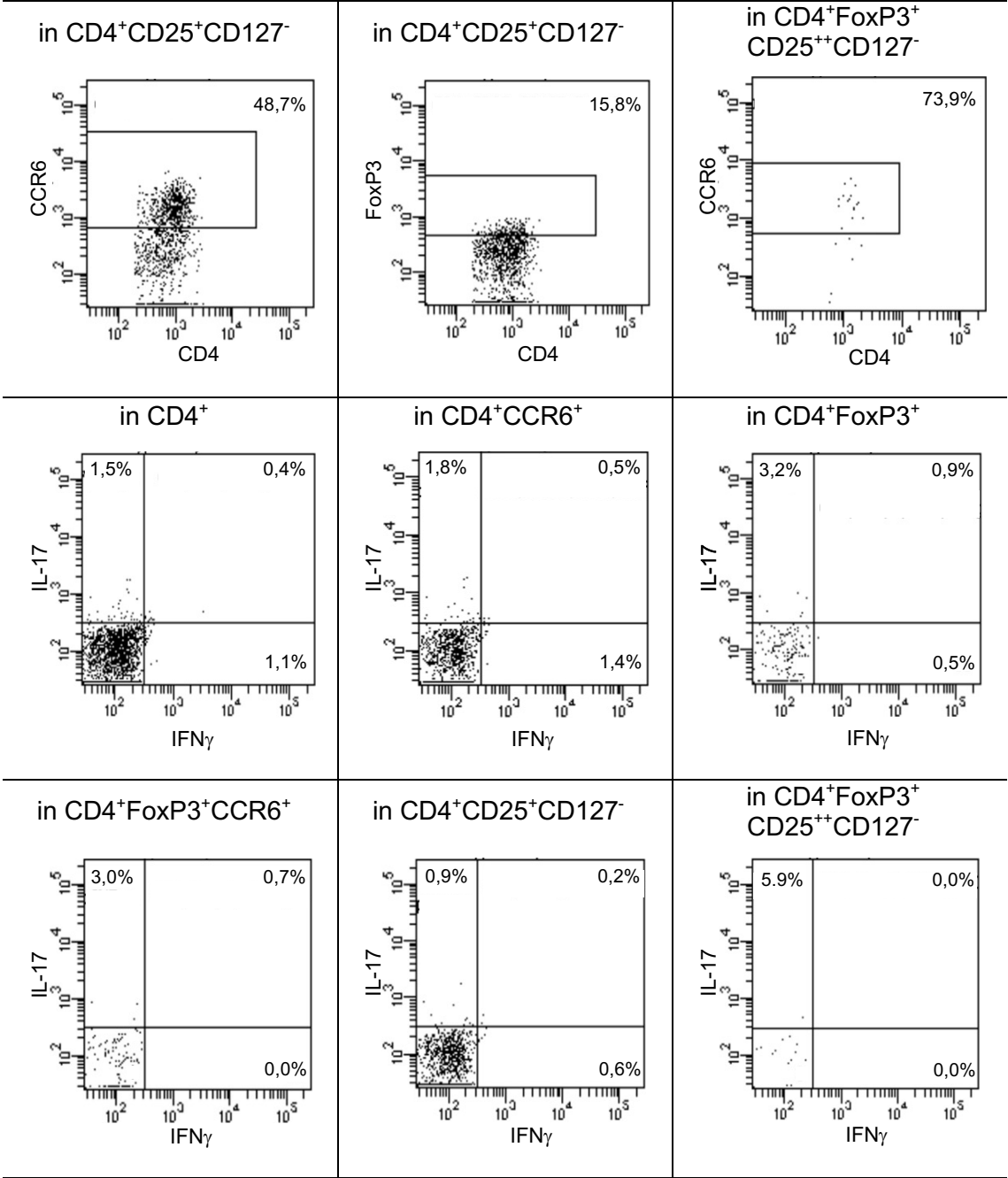
IL-17 - PSO



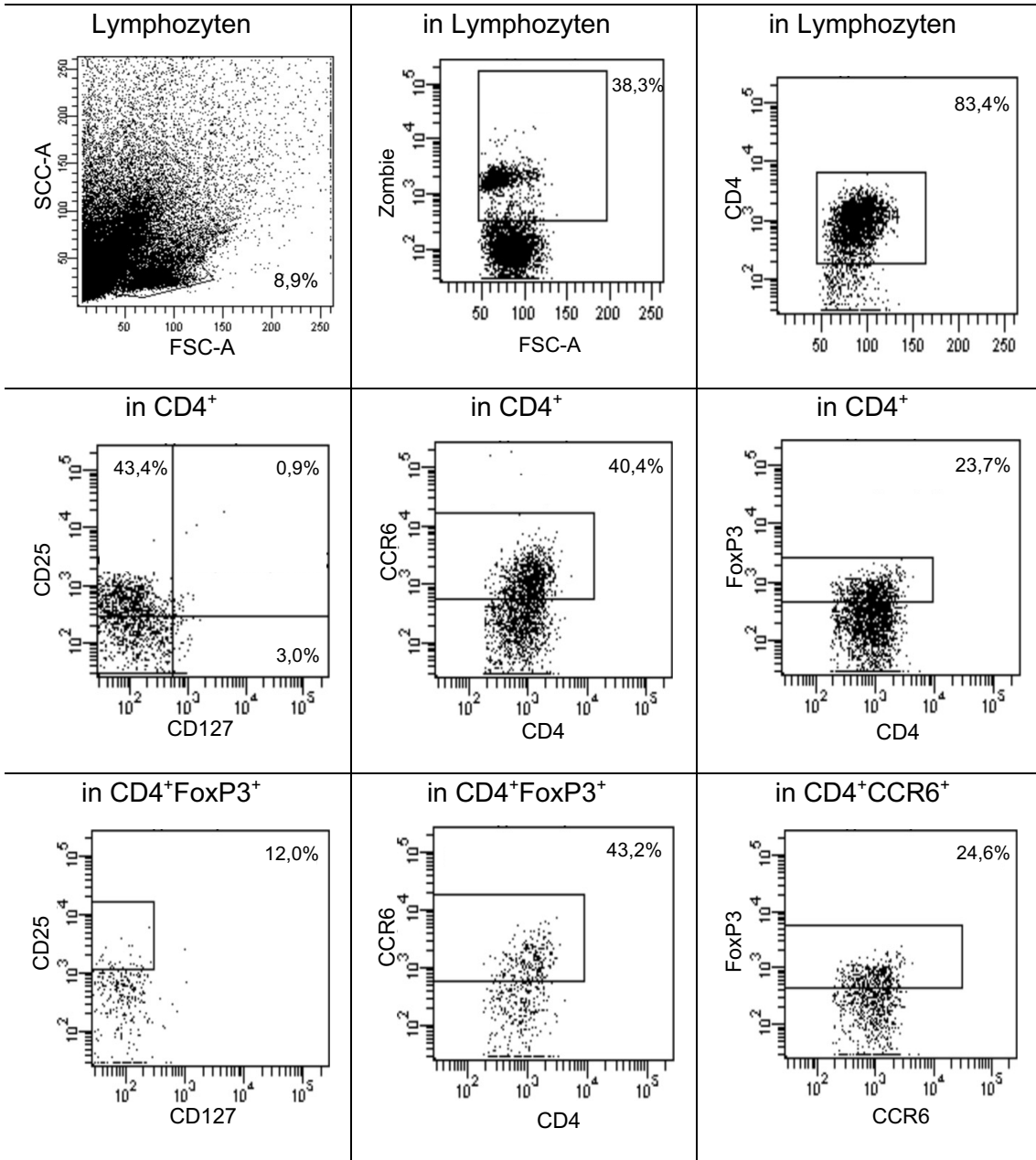


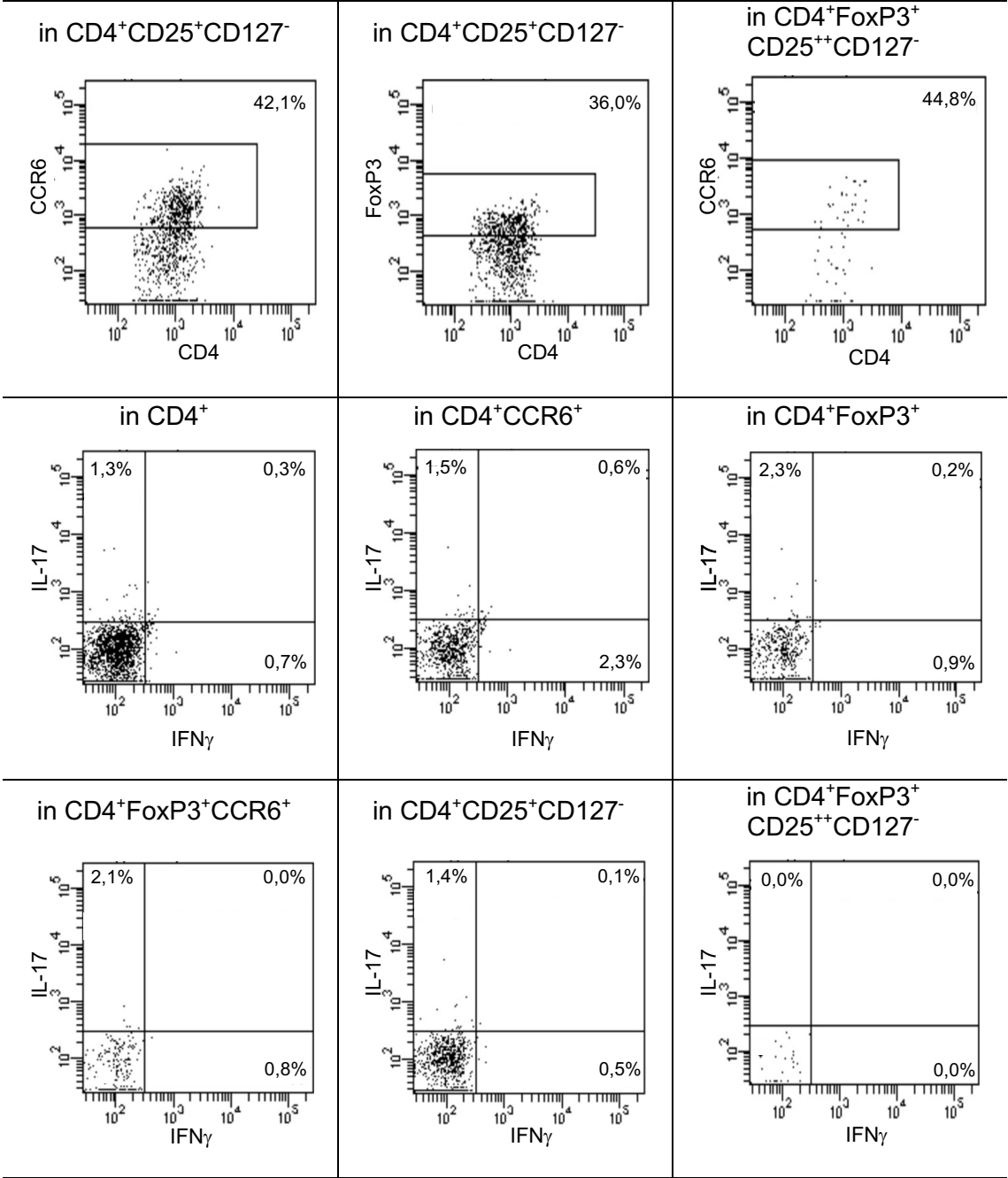
anti-IL-17 - PSO



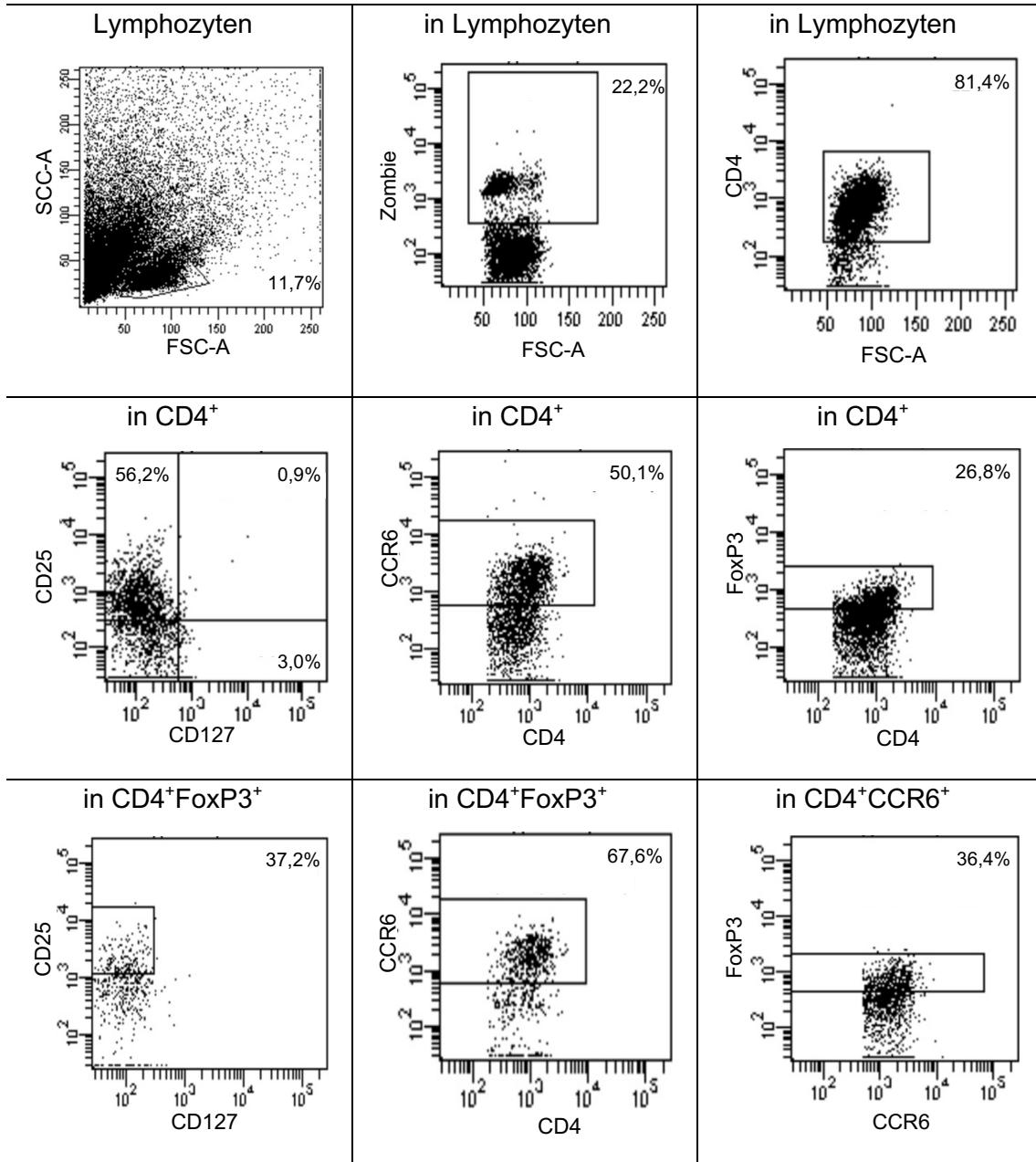


Th17 - PSO





Secukinumab - PSO



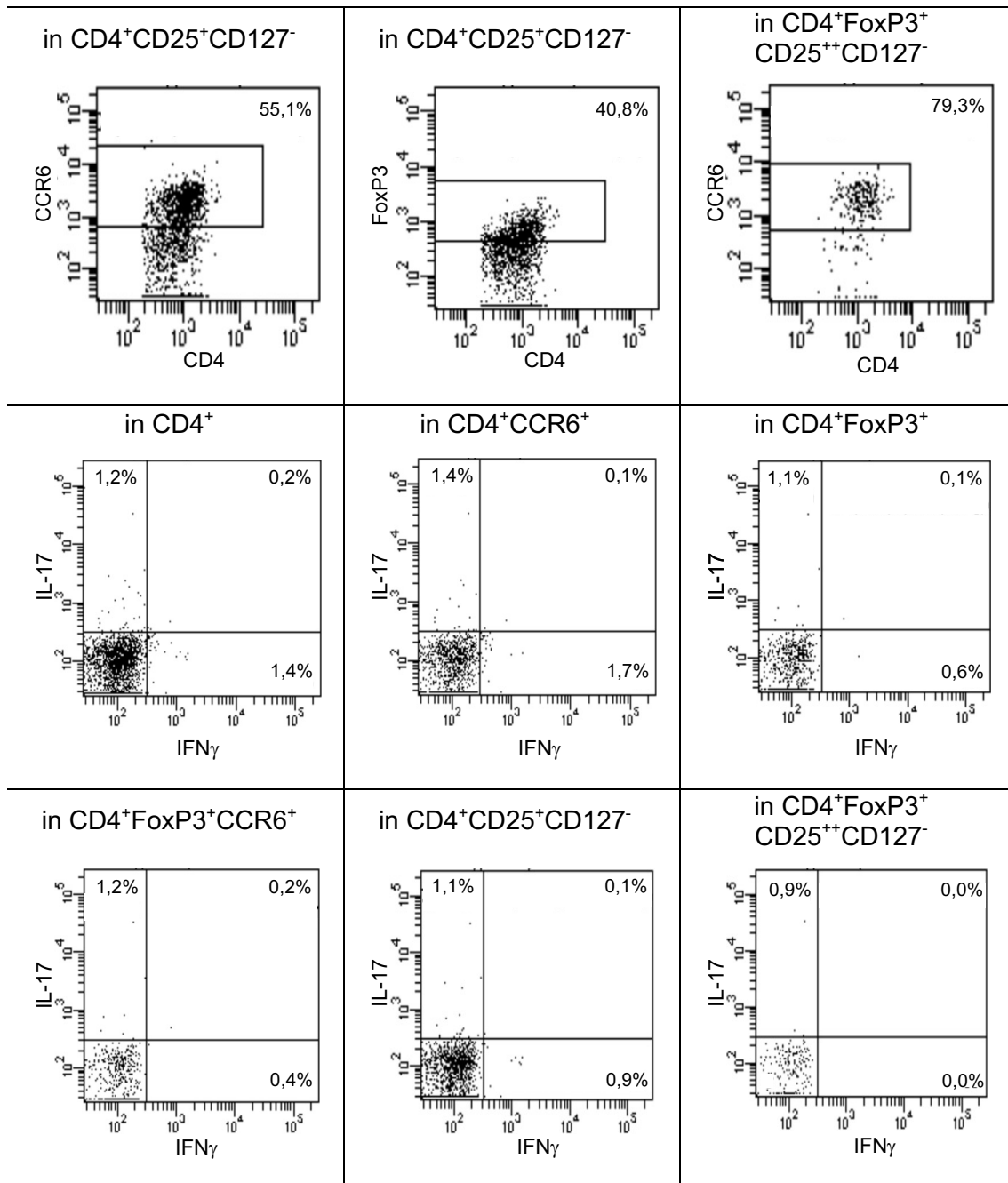


Abbildung 51: Repräsentative Dot Blots der Treg-Charakterisierung.

Dargestellt sind die Gating-Strategie der Treg-Charakterisierung als Dot-Blots für die einzelnen Stimulationen bei jeweils einer repräsentativen Probe für PSO und HC. Oberhalb der Abbildung findet sich die Population, in welcher gemessen wurde. Auf der X-Achse und der Y-Achse ist die jeweilige Messgröße aufgezeichnet. Prozentangaben finden sich in den jeweiligen Quadranten.

7.1 Eigenleistung

Rekrutierung der Patienten und der Kontrollen. Blutentnahme und Isolierung der PBMCs aus peripherem Blut. Phänotypisierung der PBMCs. Isolierung von Tregs und Zellkulturen unter verschiedenen Stimulationen. Durchführung der Suppressionsversuche. Statistische Auswertung und Diskussion der Daten.

7.2 Danksagung

Mein Dank geht an Frau Prof. Dr. Martina Prelog, welche stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch bei Rückschlägen während der Doktorarbeit konnte Sie mit Beispielen ihrer eigenen wissenschaftlichen Karriere stets die Motivation oben halten und Lösungen für alle Probleme finden. Auch während des Schreibens der Doktorarbeit konnte ich mich auf Ihre prompte Unterstützung verlassen.

Desweiteren geht ein großer Dank an PD Dr. Giovanni Almanzar, welcher mir das korrekte Arbeiten im Labor und Durchführung der Auswertungen beibrachte und mir dabei stets zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der AG Prelog bedanken, mit der ich mit viel Freude zusammen im Labor arbeiten konnte.

Dank geht auch an die Patienten und Patientinnen, welche bereit waren an der Studie teilzunehmen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, welche mich stets während der gesamten Zeit der Doktorarbeit und darüber hinaus unterstützt hat und unterstützt.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierenden Zelle
BSA	Body Surface Area
CCR	Chemokinrezeptor
CCL	Chemokinligand
CD	Cluster of differentiation
CMV	Zytomegalievirus
CNS	Conserved noncoding sequence
CRP	C-reaktives Protein
CTL(s)	Zytotoxische T-Lymphozyte(n)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DLQI	Dermatology Life Quality Index
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	Forward scatter
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulation factor
HC	Healthy control (= gesunde Kontrolle)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MACS	Magnetische Zellseparation
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MTX	Methotrexat
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NM	Nährmedium
PASI	Psoriasis Area and Severity Index

PBS	Phosphate buffered saline tablets
PBMC(s)	Periphere mononukleäre Blutzelle(n)
ROR γ t	RAR-related orphan receptor γ t
RUNX	Runt-related transcription factor
S.-Nr.	Seriennummer
S1PR1	Sphingosin-1-Phosphatrezeptor 1
STAT	Signal transducers and activators of transcription
T-bet	T-box transcription factor
TEMRA	Terminale Effektor-Memory-Zellen
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg(s)	Regulatorische T-Zelle(n)
nTregs/tTregs	Natürliche regulatorische T-Zelle(n)
iTregs/pTregs	Induzierte, aus der Peripherie stammende regulatorische T-Zelle(n)
TSDR	Treg-spezifischen demethylierten Region

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Subpopulationen der T-Zellen mit Oberflächenmolekülen.....	4
Abbildung 2: Differenzierung unterschiedlicher Th-Zell Subpopulationen.	6
Abbildung 3: Entwicklung von nTregs und pTregs.	7
Abbildung 4: Funktionsweise der Tregs.	9
Abbildung 5: Darstellung des FOXP3-Gens auf dem X-Chromosom.	11
Abbildung 6: Treg/Th17-Plastizität.....	15
Abbildung 7: Therapieoptionen bei Patienten mit Psoriasis.....	20
Abbildung 8: Reaktionsröhrchen vor und nach Dichtezentrifugation.....	34
Abbildung 9: Schema der Durchflusszytometrie (modifiziert nach [79]).	36
Abbildung 10: Populationen der PBMC in der Durchflusszytometrie.	36
Abbildung 11: Schema der magnetischen Zellseparation.	40
Abbildung 12: Schema der MACS-Isolierung von Tregs.	41
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Messung der Reinheit nach Zellseparation. ...	42
Abbildung 14: Schema Suppressionsversuch und Treg-Charakterisierung.	44
Abbildung 15: Suppressionsversuch mit zuvor stimulierten Tregs.	46
Abbildung 16: T-Zellpopulationen in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	54
Abbildung 17: CCR6, CXCR3, CCR7 in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellpopulationen.	56
Abbildung 18: Produktion von Perforin und GranzymB in T-Zell-Subpopulationen.....	57
Abbildung 19: Chemokinrezeptoren in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	60
Abbildung 20: Zytokinproduktion in CD4 ⁺ /CD8 ⁺ und Subpopulationen.	62
Abbildung 21: Treg-Charakterisierung in CD4 ⁺ -Zellen.....	63
Abbildung 22: Charakterisierung in CD4 ⁺ CCR6 ⁺ -T-Zellen	64
Abbildung 23: Charakteristika in Treg/Th17-Zellen.....	65
Abbildung 24: CCR6 ⁺ und FoxP3 ⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC.....	69
Abbildung 25: CCR6 ⁺ und FoxP3 ⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC als verbundene Darstellung.	70
Abbildung 26: IL-17 ⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC.	71
Abbildung 27: IL-17 ⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC als verbundene Darstellung.	72
Abbildung 28: IFN γ ⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC.....	73
Abbildung 29: IFN γ ⁺ in Tregs nach Stimulation bei HC als verbundene Darstellung.....	74
Abbildung 30: CCR6 ⁺ und FoxP3 ⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO.....	75
Abbildung 31: CCR6 ⁺ und FoxP3 ⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO als verbundene Darstellung.	75
Abbildung 32: IL-17 ⁺ in Tregs nach Stimulation bei Patienten mit Psoriasis.....	76
Abbildung 33: IL-17 ⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO als verbundene Darstellung. ..	77
Abbildung 34: IFN γ ⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO.....	78
Abbildung 35: IFN γ ⁺ in Tregs nach Stimulation bei PSO als verbundene Darstellung. ...	79
Abbildung 36: CCR6 ⁺ und FoxP3 ⁺ -Zellen in CD4 ⁺ -Zellen und Subpopulationen.....	80
Abbildung 37: IL-17 ⁺ -Zellen in CD4 ⁺ -Zellen und Subpopulationen.....	82
Abbildung 38: IFN- γ ⁻ und IL-17 ⁺ IFN- γ ⁻ - Zellen in CD4 ⁺ -Zellen und Subpopulationen....	83
Abbildung 39: Reinheitsmessung nach Treg-Isolierung bei PSO und HC.	89

Abbildung 40: Proliferation der PBMCs ohne Tregs (1:0) und mit Tregs (1:1) in HC.....	90
Abbildung 41: Inhibition der Tregs in der HC.	91
Abbildung 42: Proliferation der PBMCs ohne Tregs (1:0) und mit Tregs (1:1) in PSO....	93
Abbildung 43: Inhibition der Tregs in PSO.....	94
Abbildung 44: Proliferation der PBMCs ohne Tregs (1:0) und mit Tregs (1:1) in PSO und HC.....	96
Abbildung 45: Inhibition der Tregs in der Patienten- und Kontrollkohorte	96
Abbildung 46: Proliferation der PBMCs ohne Tregs (1:0) und mit Tregs (1:1) in Th17- Milieu und Th17 mit Secukinumab.....	100
Abbildung 47: Inhibition der PBMCs unter Th17 und Th17 mit Secukinumab.....	101
Abbildung 48: Proliferation der PBMCs in unterschiedlichen Milieu nach Stimulation der Treg-Zellen.	103
Abbildung 49: Inhibition der PBMCs in unterschiedlichen Milieu nach Stimulation der Treg-Zellen und Verhältnis der Tregs zu PBMCs.	104
Abbildung 50: Repräsentative Dot Blots der PBMC-Charakterisierung.	164
Abbildung 51: Repräsentative Dot Blots der Treg-Charakterisierung.	188

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verlaufsformen der Psoriasis [66].	18
Tabelle 2: Geräte	23
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 4: Puffer und Medien	27
Tabelle 5: Gebrauchsfertige Lösungen	28
Tabelle 6: Gebrauchsfertige Kits	28
Tabelle 7: Stimulationen und Hemmstoffe	29
Tabelle 8: Antikörper zur Zellfärbung	30
Tabelle 9: Chemikalien und Gase	32
Tabelle 10: Färbepanel für PBMC-Charakterisierung	38
Tabelle 11: Verschiedene Stimuli bei der in-vitro Kultur von Treg-Zellen	43
Tabelle 12: Konzentrationen der einzelnen Stimuli	43
Tabelle 13: Ansätze und Stimuli	45
Tabelle 14: Demografie der gesamten Studienpopulation	48
Tabelle 15: Klinische Daten der Patienten mit Psoriasis	49
Tabelle 16: Klinische Daten und Demografie einzelner PSO	50
Tabelle 17: Demografie der HC	51
Tabelle 18: Demografie der Spender von unstimulierten PBMCs	52
Tabelle 19: Klinische Daten der Spender von unstimulierten PBMCs	53
Tabelle 20: Oberflächenmarker der T-Zell Subpopulationen	54
Tabelle 21: Prozentuale Verteilung der T-Zell Subpopulationen in CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-Zellen.	57
Tabelle 22: Chemokine in CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-Zellen	59
Tabelle 23: Zytokine in CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-Zellen und Subpopulationen	61
Tabelle 24: Charakteristika Treg und CCR6 ⁺ -Zellen	64
Tabelle 25: Charakteristika Treg/Th17-Zellen	66
Tabelle 26: Demografische Daten von PSO und HC der Treg-Charakterisierung	67
Tabelle 27: Klinische Daten von PSO und HC der Treg-Charakterisierung	67
Tabelle 28: Prozentuale Verteilung CCR6 ⁺ Zellen in CD4 ⁺ Zellen und Subpopulationen	84
Tabelle 29: Prozentuale Verteilung von IL17 ⁺ Zellen und FoxP3 ⁺ -Zellen in CD4 ⁺ Zellen und Subpopulationen	85
Tabelle 30: Prozentuale Verteilung von IFN γ ⁺ und IL-17 ⁺ in CD4 ⁺ -Zellen und Subpopulationen	86
Tabelle 31: Demografische Daten von PSO und HC des Suppressionsversuchs	87
Tabelle 32: Klinische Daten der PSO des Suppressionsversuchs	88
Tabelle 33: Reinheit der Tregs nach Isolierung	89
Tabelle 34: Proliferation und Inhibition der Tregs in unterschiedlichen Stimuli in Vergleich zur positiven Kontrolle	91
Tabelle 35: Proliferation und Inhibition der PBMCs in PSO im Vergleich zur positiven Kontrolle	94
Tabelle 36: Repräsentatives Beispiel des Suppressionsversuchs bei HC und PSO	97

Tabelle 37: Demografische Daten des Suppressionsversuchs unter proinflammatorischem Milieu mit Secukinumab.....	99
Tabelle 38: Proliferation und Inhibition der PBMCs von HC in Th17-Milieu und Th17 mit Secukinumab.	101
Tabelle 39: Demografische Daten des Treg-Stimulationsversuch.....	102
Tabelle 40: Repräsentatives Beispiel von Histogrammen einer Kontrolle des Suppressionsversuches mit vorstimulierten Tregs.....	104
Tabelle 41: Proliferation und Inhibition von PBMCs bei vorstimulierten Tregs unter verschiedenen Stimuli.	105

V Veröffentlichung und Kongressteilnahmen

- 06/2017 Teilnahme am Symposium „Regulation of T cell response“
- 09/2017 45. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie
- 09/2017 Posterpräsentation auf dem DGRh-Kongress mit dem Titel
„In vitro Einfluss von Interleukin-17-Antikörpern auf Phänotyp und
Funktion von regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit
Psoriasis/Psoriasis-Arthritis“