

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Prof. Dr. med. M. P. Schön)

im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umweltmedizin und Dermatologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Dynamische Interaktion zwischen Leukozyten und
Endothelzellen unter dem Einfluss von TNF α und
Adalimumab**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Anike Lena Elisabeth Lockmann
aus
Paderborn

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. P. Schön

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2015

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Psoriasis	1
1.1.1	Epidemiologie und Allgemeines	1
1.1.2	Klinik und Histologie	2
1.1.3	Pathogenese: Genetik	3
1.1.4	Immunpathogenese	4
1.1.5	Extravasation der Leukozyten (Interaktion mit Endothelzellen)	6
1.2	TNFα	8
1.2.1	Struktur und Produktion	8
1.2.2	Funktion	8
1.2.3	TNF α und Psoriasis	10
1.3	Therapie der Psoriasis	10
1.3.1	Allgemeines zur Therapie	10
1.3.2	Lokaltherapie und Lichttherapie	11
1.3.3	Systemtherapie	12
1.3.4	Anti-TNF α -Therapie	13
1.4	Adalimumab	14
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte	17

2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.3	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	19
2.1.4	Chemikalien.....	19
2.1.5	Antikörper	20
2.1.6	Zellen.....	21
2.1.7	Puffer/Lösungen/Medium.....	21
2.1.8	Software	22
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellkultur- Methoden.....	22
2.2.1.1	HUVEC.....	22
2.2.1.2	Kultivierung von HUVEC.....	22
2.2.1.3	Passagieren von adhärenenten Zellen	23
2.2.1.4	HUVEC einfrieren und auftauen	24
2.2.1.5	Aussäen adhärenenten HUVEC für Flusskammerversuche, PCR oder Immunfluoreszenz	25
2.2.2	Präparation der PBMC.....	25
2.2.2.1	Gesunde Probanden und Psoriasis-Patienten.....	25
2.2.2.2	Lymphozytenisolierung aus peripherem venösen Blut.....	27
2.2.2.3	CFDA-SE-Färbung	28
2.2.2.4	PBMC einfrieren	29
2.2.2.5	PBMC auftauen	29
2.2.3	Flusskammerversuche.....	29
2.2.3.1	Prinzip der Flusskammer	29
2.2.3.2	Vorbereitung des Flusskammerexperiments	31
2.2.3.3	Durchführung der Flusskammerexperimente.....	32
2.2.4	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> : FACS).....	34

2.2.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	34
2.2.4.2	Durchführung der Durchflusszytometrie	34
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> : PCR).....	35
2.2.5.1	RNA-Isolierung mit DNase-Verdau (Probengewinnung für die Polymerase-Kettenreaktion)	35
2.2.5.2	Vorbereitung der reversen Transkription: Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts.....	37
2.2.5.3	Reverse Transkription.....	37
2.2.5.4	Prinzip der PCR	38
2.2.5.5	Durchführung der PCR	39
2.2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	40
2.2.6	Immunfluoreszenz	41
2.2.6.1	Prinzip der Immunfluoreszenz	41
2.2.6.2	Durchführung der Immunfluoreszenz.....	42
2.2.7	Statistische Auswertung	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	Rollen und Adhäsion der Lymphozyten des peripheren Blutes an kultivierten Endothelzellen werden durch TNFα stimuliert	45
3.2	Einfrieren der PBMC ohne Einfluss auf Zusammensetzung und funktionelle Eigenschaften.....	48
3.3	Der Zeitpunkt der Adalimumab-Behandlung ist entscheidend für die Wirkung auf TNFα-stimulierte Endothelzellen.....	51
3.3.1	Adalimumab beeinflusst dynamische Interaktionen kultivierter Endothelzellen mit Lymphozyten	51

3.3.2	Der Zeitpunkt der Adalimumab-Behandlung bestimmt die TNF α -induzierte Transkription endothelialer Adhäsionsmoleküle	53
3.3.3	Adalimumab reduziert die Zelloberflächen-Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin auf kultivierten Endothelzellen .	55
3.4	Die Interaktion von Lymphozyten mit TNFα-stimulierten Endothelzellen <i>in vitro</i> ist unabhängig von klinischer Wirksamkeit von Adalimumab	56
4	DISKUSSION	60
4.1	Inter-individuelle Unterschiede der Interaktion von Lymphozyten <i>ex vivo</i> mit kultivierten Endothelzellen als Prädiktor für klinisches Ansprechen auf Adalimumab?	60
4.2	Klinische Bedeutung der Abhängigkeit der Adalimumabwirkung vom Zeitpunkt der Behandlung <i>in vitro</i>.....	65
5	ZUSAMMENFASSUNG	69
6	LITERATURVERZEICHNIS	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Immunpathogenese der Psoriasis.	6
Abbildung 2: Interaktion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen.	7
Abbildung 3: Adalimumab	15
Abbildung 4: Ficoll-Gradient nach Zentrifugation.	27
Abbildung 5: Flusskammer.....	30
Abbildung 6: Auswahl der Gesichtsfelder für die feste Adhäsion.	33
Abbildung 7: Inter-individuelle Unterschiede in der Interaktion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen nach TNF α -Stimulation.....	47
Abbildung 8: Unveränderte phänotypische Merkmale der PBMC nach Kryokonservierung.	49
Abbildung 9: Keine signifikante Änderung der dynamischen Interaktionen von frisch isolierten und kryokonservierten PBMC mit Endothelzellen in der Flusskammer.	50
Abbildung 10: Zeit- und Konzentrationsreihen der Adalimumab-Inkubation TNF α -stimulierter Endothelzellen in Interaktion mit PBMC im Flusskammerversuch.....	52
Abbildung 11: TNF α und Adalimumab beeinflussen die Expression von VCAM-1 (CD106), ICAM-1 (CD54) und E-Selektin (CD62E) auf kultivierten Endothelzellen.	54
Abbildung 12: Die Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin auf TNF α -stimulierten Endothelzellen wird durch Adalimumab unterdrückt.....	56
Abbildung 13: Rollen und feste Adhäsion der PBMC von 10 Psoriasis-Patienten auf TNF α -stimulierten Endothelzellen zeigen im Flusskammerversuch inter-individuelle Unterschiede.....	58

Abbildung 14: Die *in vitro* Interaktion zwischen PBMC von Psoriasis-Patienten und kultivierten Endothelzellen ist unabhängig vom klinischen Ansprechen auf Adalimumab.....59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 3: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	19
Tabelle 4: Chemikalien	19
Tabelle 5: Antikörper	20
Tabelle 6: Zellen	21
Tabelle 7: Software	22
Tabelle 8: Primersequenzen und Versuchsbedingungen PCR	40

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CD	<i>Cluster of differentiation (engl.)</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CFDA-SE	Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HBSS	Hanks Salzlösung (engl. <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA	Humanes Leukozytenantigen (engl. <i>human leukocyte antigen</i>)
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (engl. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL23R	Interleukin-23-Rezeptor
INF α	Interferon-alpha
INF γ	Interferon-gamma

LFA-1	Lymphozytenfunktion-assoziiertes-Antigen-1 (engl. <i>lymphocyte function associated antigen 1</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major-histocompatibility-complex</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
NF-κB	Nukleärer Faktor Kappa B (engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells</i>)
PASI	Psoriasis-Ausdehnungs-und-Schweregrads-Index (engl. <i>psoriasis area and severity index</i>)
PBMC	Periphere Blut-Monozyten (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PSORS	Psoriasis-Suszeptibilitäts-Locus (engl. <i>psoriasis susceptibility locus</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
TACE	TNFα-konvertierendes Enzym (engl. <i>TNFα converting enzyme</i>)
Tc-Zelle	Zytotoxische T-Zelle
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF-R	Tumornekrosefaktor-alpha-Rezeptor
VCAM-1	Vaskuläres Adhäsionsmolekül 1 (engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLA-4	Alpha-4-Beta-1-Integrin (engl. <i>very late antigen 4</i>)

1 Einleitung

1.1 Psoriasis

1.1.1 Epidemiologie und Allgemeines

Die Schuppenflechte (Psoriasis) ist eine chronische Haut- und Systemerkrankung, die weltweit etwa 2% der Bevölkerung betrifft, allerdings mit deutlichen regionalen und ethnischen Unterschieden (Christophers 2001, Crow 2012, Schön und Boehncke 2005). Als eigene Entität wurde die Psoriasis erst in der Mitte des 19. Jahrhunderts durch den Wiener Dermatologen Ferdinand Ritter von Hebra beschrieben, nachdem sie zuvor als Variante der Lepra angesehen wurde (Hebra und Elfinger 1859, Lowes et al. 2007, Schön und Boehncke 2005, Schön et al. 2005). Von den verschiedenen Manifestationsformen der Psoriasis ist die Psoriasis vulgaris mit einem Anteil von 90% an allen Erkrankten die häufigste (Griffiths und Barker 2007), weitere sind unter anderem Psoriasis guttata (2% aller Psoriatiker), inverse Psoriasis und pustulöse Psoriasis (Crow 2012, Langley et al. 2005, Schön und Boehncke 2005). Bei der Psoriasis vulgaris beobachteten Henseler und Christophers 1985 bei 2147 Patienten zwei Altersgipfel der Erstmanifestation, wobei der eine Gipfel bei 16 (weiblich) beziehungsweise 22 (männlich) und der andere bei 60 (weiblich) beziehungsweise 57 (männlich) Jahren lag. Die frühe und die späte Manifestationsform weisen einige Unterschiede hinsichtlich des Ablaufs der Erkrankung, der familiären Häufung und dem Auftreten genetischer Marker auf (Henseler und Christophers 1985). Neben der reinen Hautmanifestation können im Rahmen der Psoriasis die Nägel sowie die Gelenke (Psoriasis-Arthritis) befallen sein. Nagelveränderungen treten bei etwa 50% der Patienten auf, der Anteil der Patienten mit Gelenkbeteiligung wird auf etwa 20-25% geschätzt (Griffiths und Barker 2007, Schön et al. 2005).

1.1.2 Klinik und Histologie

Klinisch treten bei der Psoriasis vulgaris scharf begrenzte rote Plaques mit weißlicher Schuppung auf, die vor allem an den Streckseiten der Extremitäten sowie lumbal und an der Kopfhaut lokalisiert sind (Schön et al. 2005). Diese Plaques entsprechen histologisch einer Hyperproliferation der Epidermis, insbesondere ist das Stratum spinosum zapfenartig verbreitert (Akanthose) und die Reifung (Differenzierung) der Keratinozyten erfolgt unvollständig und vorzeitig (Nestle et al. 2009). Obwohl die Epidermis insgesamt verdickt ist, ist das Stratum granulosum stark verschmälert (Lowe et al. 2007). Zusätzlich kommt es durch die Hyperproliferation zu einem deutlich beschleunigten Aufsteigen der Keratinozyten von der Basalzellschicht an die Oberfläche, sodass dieser Zeitraum von normalerweise 40 bis 56 Tagen auf 6 bis 8 Tage verkürzt ist (Halprin 1972). Diese Beschleunigung und die veränderten Abläufe der Differenzierung der Keratinozyten resultieren in einer Parakeratose, also dem Vorhandensein noch kernhaltiger Keratinozyten im Stratum corneum (Lowe et al. 2007). Weiterhin typisch sind deutlich verlängerte Reteleisten der Epidermis. In der Dermis sind die Blutgefäße des oberen Plexus deutlich erweitert und vermehrt, was sich klinisch in der Rötung des betroffenen Areals äußert (Lowe et al. 2007). Darüber hinaus sind auch die Endothelzellen der kutanen Blutgefäße aktiviert und exprimieren auf ihrer Oberfläche vermehrt Rezeptoren, welche für Interaktionen mit Zellen des Immunsystems relevant sind (Lowe et al. 2007). Passend zur heutigen Einschätzung der Psoriasis als eine immunologische Erkrankung ist die vermehrte Ansammlung immunologischer Zellen in den Plaques (Nestle et al. 2009). Dabei infiltrieren sowohl Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems in die Haut. Zu den ersteren Zellen gehören neutrophile Granulozyten, die in der Epidermis in so genannten Munroschen Mikroabszessen akkumulieren (Schön und Boehncke 2005). Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen sind in der Dermis vermehrt (Lowe et al. 2007). Von den Zellen des adaptiven Immunsystems werden in erster

Linie T-Lymphozyten in psoriatische Läsionen rekrutiert, wobei CD4⁺ T-Zellen in der Dermis und CD8⁺ T-Zellen in der Epidermis überwiegen (Lowe et al. 2007).

1.1.3 Pathogenese: Genetik

Die Psoriasis ist durch ein komplexes Zusammenspiel aus genetischer Disposition und auslösenden Umwelteinflüssen gekennzeichnet, deren Zusammenhänge noch nicht vollständig geklärt sind. Als auslösende Faktoren gelten unter anderem Streptokokken-Infektionen der Atemwege, verschiedene Medikamente wie β -Blocker oder Lithium sowie HIV-Infektionen (Mak et al. 2009, Schön und Boehncke 2005). Die genetische Komponente zeigt sich deutlich in der familiären Häufung. Bei etwa der Hälfte der Patienten mit Psoriasis ist ein weiteres Familienmitglied erkrankt (positive Familienanamnese), dies gilt vor allem für Patienten, bei denen sich die Psoriasis vor dem 30. Lebensjahr manifestiert (Altobelli et al. 2007). So haben die Geschwister einer an Psoriasis erkrankten Person im Vergleich zur übrigen Bevölkerung ein vier- bis sechsfach erhöhtes Risiko, ebenfalls an Psoriasis zu erkranken (Roberson und Bowcock 2010). Bisher konnten im menschlichen Genom verschiedene so genannte Psoriasis-Suszeptibilitäts-Loci (engl. *psoriasis susceptibility loci*; PSORS 1-10) identifiziert werden, deren Vorhandensein überzufällig häufig mit dem Auftreten der Psoriasis assoziiert ist. Am deutlichsten ist das Allel des humanen Leukozytenantigen-Systems Cw6 (HLA-Cw6) der MHC-Region auf Chromosom 6 (PSORS1) mit der Manifestation der Psoriasis assoziiert, welches bei etwa 50% der Patienten mit Psoriasis vulgaris und nur bei 7,4% der gesunden Individuen in Nordeuropa nachzuweisen ist (Mak et al. 2009, Tiilikainen et al. 1980). Das Vorhandensein dieses Allels korreliert mit einem 10- bis 20-fachen Risiko für das Auftreten der Psoriasis, wobei homozygote Träger im Vergleich zu heterozygoten Individuen noch einmal ein fast dreifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung der Erkrankung haben (Gudjonsson et al. 2003). Trotz dieser seit Jahren bekannten Assoziation

zwischen HLA-Cw6 und dem Auftreten der Psoriasis konnte die genaue Funktion dieses Allels bislang nicht genau charakterisiert werden (Mak et al. 2009). Obwohl viele Assoziationsstudien durchgeführt wurden, gibt es bei dieser komplexen Krankheit mit den verschiedenen genetischen und klinischen Ausprägungen noch einige Unklarheiten. Insbesondere die Bedeutung genetischer Risikofaktoren, die sich mit anderen immunologischen Erkrankungen überlappen, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Hierzu zählen unter anderem Varianten im Interleukin-23-Rezeptor (IL23R) sowie im Interleukin-12B (IL-12B) (Bowcock und Krueger 2005, Nestle et al. 2009). Neben diesen klassischen genetischen Veränderungen sind in den letzten Jahren zunehmend regulatorische Veränderungen anhand der Höhe der vorliegenden mRNA in betroffener und nicht betroffener Haut sowie im Blut untersucht worden. Bei diesen Untersuchungen ergaben sich bisher mehr als 4000 Unterschiede über das gesamte Genom, deren genaue Bedeutung vielfach noch nicht geklärt ist. Allerdings zeichnet sich bereits ab, dass viele der fehlregulierten Gene eine Rolle in den Entzündungssignalwegen spielen (Suarez-Farinas et al. 2012).

1.1.4 Immunpathogenese

Die Psoriasis wird nach heutigem Wissensstand als eine hauptsächlich durch T-Lymphozyten vermittelte Erkrankung eingeordnet (Schön und Boehncke 2005). Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Entdeckung, die in den 1990er Jahren gemacht wurde: Bei einem bisher gesunden Empfänger trat nach Transplantation des Knochenmarks eines an Psoriasis erkrankten Spenders ebenfalls eine Psoriasis auf (Gardembas-Pain et al. 1990). Hingegen heilte bei einem an Psoriasis erkrankten Empfänger die Psoriasis nach Transplantation des Knochenmarks eines Gesunden ab (Eedy et al. 1990). Die T-Helfer-Lymphozyten (Th-Zellen, CD4 positiv) werden nach ihrem Zytokinmuster klassischerweise in die Th1- und Th2-Untergruppe unterschieden (Mosmann und Coffman 1989, Mosmann und Sad 1996). Ebenso werden die CD8-positiven T-Lymphozyten

(zytotoxische T-Zellen, Tc-Zellen) in Tc1- oder Tc2-Zellen eingeteilt (Krueger 2002). Das Zytokinprofil, welches im Rahmen der Psoriasis auftritt, ist vor allem durch Interleukin-2 (IL-2), Interferon-gamma (INF γ) und TNF-alpha (TNF α) geprägt, die typisch für die Typ-1-Untergruppe sind (Austin et al. 1999, Nickoloff et al. 2007, Schlaak et al. 1994, Uyemura et al. 1993). Neben diesen lange bekannten klassischen Untergruppen wurde eine weitere T-Zell-Population, die Th17-Zellreihe, identifiziert, die wesentlich an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt ist (Mak et al. 2009, Nograles et al. 2010). Diese Th17-Zellen werden vor allem durch IL-23, welches von dendritischen Zellen und Makrophagen produziert wird, induziert (Nograles et al. 2010).

Insgesamt kommt es bei der Psoriasis nach Aktivierung plasmazytoider dendritischer Zellen durch verschiedene Auslöser, unter anderem physikalische oder bakterielle Produkte, über die Freisetzung von Interferon-alpha (INF α) zur Aktivierung myeloischer dendritischer Zellen (Nestle et al. 2009). Diese wandern nach der gegenwärtig vorherrschenden Hypothese in die Lymphknoten aus und aktivieren dort T-Zellen zur Differenzierung zu Th1- und Th17-Zellen sowie zu Tc1- und Tc17-Zellen (Nestle et al. 2009). Nach Aktivierung durch myeloische dendritische Zellen werden vor allem durch die aktivierten Th1- und Th17-Lymphozyten Interleukin-17 (IL-17), Interleukin-22 (IL-22), INF γ und TNF α produziert (Johnson-Huang et al. 2012, Nestle et al. 2009).

Sowohl IL-17 als auch IL-22 beeinflussen Differenzierung und Funktion der Keratinozyten, wobei beide Zytokine zu vermehrter Produktion antimikrobieller Peptide durch die Keratinozyten führen (Boniface et al. 2005, Johnson-Huang et al. 2012, Nograles et al. 2010, Sa et al. 2007). Durch IL-17 werden zusätzlich durch die Expression von Chemokinen weitere T-Zellen rekrutiert und durch IL-22 kommt es zu fehlregulierter Differenzierung der Keratinozyten sowie zur Akanthose (Boniface et al. 2005, Johnson-Huang et al. 2012, Nograles et al. 2010, Sa et al. 2007).

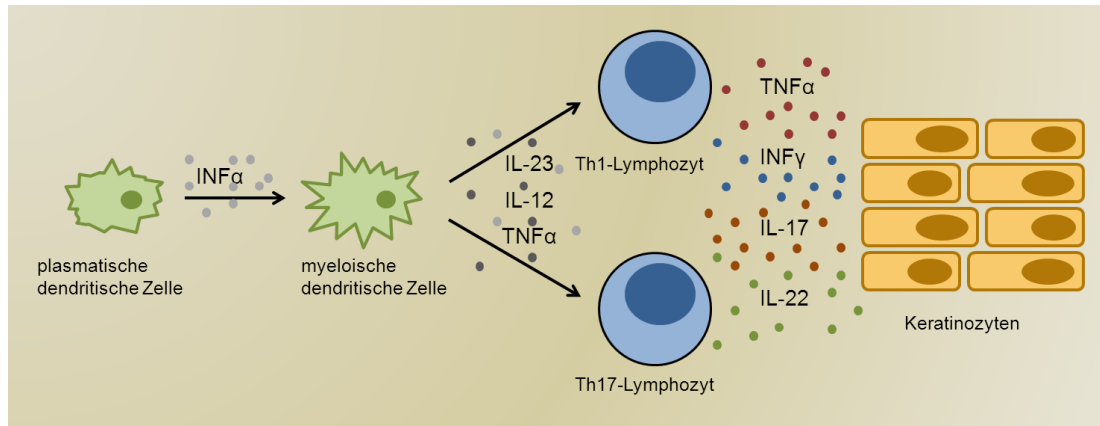


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Immunpathogenese der Psoriasis.

Die plasmazytoide dendritische Zelle aktiviert durch Freisetzung von $\text{INF}\alpha$ myeloische dendritische Zellen. Diese aktivieren über verschiedene Zytokine T-Lymphozyten zu Th1 und Th17-Effektorzellen. Durch die Produktion von $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$, IL-17 und IL-22 werden Differenzierung und Funktion der Keratinozyten beeinflusst.

Insgesamt ist bei der Psoriasis ein komplexes Netzwerk von immunologischen Zellen, Zytokinen, Chemokinen und Keratinozyten anzutreffen, welches noch nicht vollständig verstanden ist (Bowcock und Krueger 2005, Nestle et al. 2009, Nickoloff et al. 2007). Eine wichtige Funktion kommt $\text{TNF}\alpha$ bei dieser Erkrankung zu, welches als Entzündungsmediator an der Aktivierung der Immunzellen maßgeblich beteiligt ist (Nestle et al. 2009).

1.1.5 Extravasation der Leukozyten (Interaktion mit Endothelzellen)

Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Psoriasis ist die Auswanderung der Lymphozyten, die eine Schlüsselrolle im Entzündungsprozess der Psoriasis innehaben (siehe 1.1.4), von der Blutbahn in die Haut (Schön et al. 2003). Der erste Schritt dieser Auswanderung ist das Rollen der Leukozyten an den Endothelzellen, an dem vor allem Selektine beteiligt sind (Schön 2005, Schön et al. 2003, Zollner und Asadullah 2003). Neben L-Selektin (CD62L), das auf Leukozyten exprimiert wird, spielen hierbei vor allem E-Selektin (CD62E) und P-Selektin (CD62P) eine wichtige Rolle, die von Endothelzellen nach Aktivierung durch $\text{TNF}\alpha$, Interleukin-1 (IL-1) oder bakterielle Lipopolisaccharide synthetisiert und auf diesen exprimiert

werden (Groves et al. 1991, Springer 1994). Nachdem ein erster Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen durch das Rollen hergestellt wurde, folgt als nächster Schritt der Auswanderung die feste Adhäsion. Diese wird vor allem durch die Interaktion von interzellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1 entspricht CD54) und vaskulärem Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1 entspricht CD106), welche auf Endothelzellen exprimiert werden, mit dem Lymphozytenfunktion-assoziierten-Antigen-1 (LFA-1) und dem Alpha-4-Beta-1-Integrin (VLA-4), welche auf den Leukozyten vorhanden sind, vermittelt (Schön et al. 2003, Shimizu et al. 1991, Springer 1994).

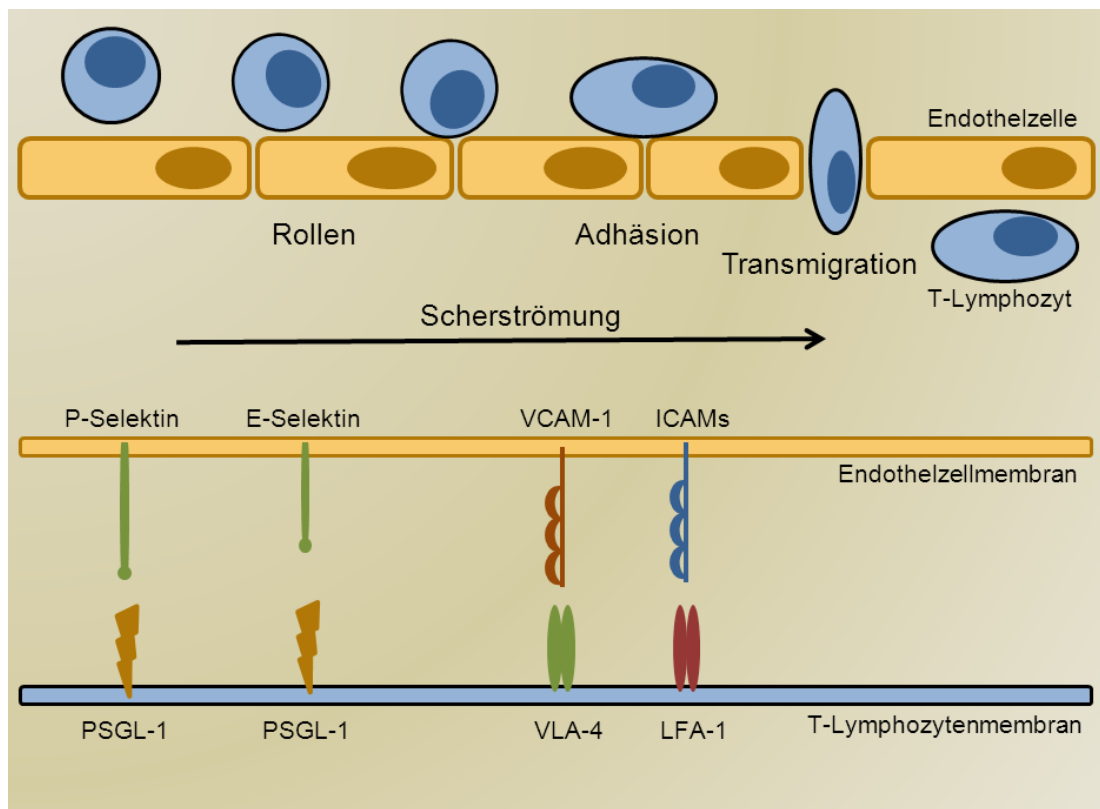


Abbildung 2: Interaktion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen.

VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin auf den Endothelzellen interagieren mit Rezeptoren der Leukozyten und vermitteln das Anhaften, Rollen und die feste Adhäsion der Lymphozyten.

Durch verschiedene proinflammatorische Zytokine, zu denen auch TNF α gehört und die bei der Psoriasis erhöht sind (Etehadhi et al. 1994, Yao et al. 2008), werden diese Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen vermehrt exprimiert, was eine verstärkte Auswanderung der Lymphozyten in das Gewebe erlaubt (Barker und Nickoloff 1992, Klein et al. 1995, Lowes et al. 2007, Schön und Boehncke 2005, Terajima et al. 1998).

1.2 TNF α

1.2.1 Struktur und Produktion

TNF α ist ein aus drei gleichen Untereinheiten bestehendes Protein (Homotrimer) (Schottelius et al. 2004). Es kommt sowohl membran-gebunden (26 kDa) als auch löslich (17 kDa) vor, wobei beide Formen biologisch wirksam sind (Fantuzzi et al. 2008). Die lösliche Form entsteht aus der membrangebundenen Form durch enzymatische Abspaltung zwischen den Aminosäuren Alanin und Valin durch das TNF α -konvertierende Enzym (TACE) (Fantuzzi et al. 2008, Horiuchi et al. 2010). TNF α kann von vielen verschiedenen Zelltypen produziert werden, vor allem aber von Monozyten und Makrophagen (Horiuchi et al. 2010, Schottelius et al. 2004). Auch bei der Psoriasis sind dendritische Zellen und Makrophagen die hauptsächlichen Produzenten von TNF α (Marble et al. 2007). Die Synthese von TNF α wird durch verschiedene Stimuli angeregt, zum Beispiel durch Produkte von Viren oder Bakterien wie Lipopolysaccharide, aber auch durch Zytokine oder Ischämie (Locksley et al. 2001, Schottelius et al. 2004). Die Produktion von TNF α wird auf verschiedenen Ebenen, unter anderem auf transkriptioneller Ebene, reguliert (Schottelius et al. 2004).

1.2.2 Funktion

Die Hauptfunktionen von TNF α bestehen in der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen, Apoptoseinduktion maligner und infizierter Zellen sowie der Regulation inflammatorischer Prozesse (Schottelius et al.

2004). Diese Effekte werden durch die Bindung an TNF α -Rezeptoren (TNF-R) vermittelt, von denen zwei verschiedene existieren: TNF α -Rezeptor-1 (TNF-R1) und TNF α -Rezeptor-2 (TNF-R2) (Fantuzzi et al. 2008, Schottelius et al. 2004). TNF-R1 wird auf fast allen Zelltypen exprimiert, TNF-R2 vor allem auf Endothelzellen und hämatopoietischen Zellen. TNF-R2 scheint hauptsächlich eine unterstützende Funktion zu haben, indem er TNF α , vor allem wenn es in niedrigen Konzentrationen vorliegt, zum TNF-R1 schleust (Fantuzzi et al. 2008, Schottelius et al. 2004).

Die inflammatorische Wirkung von TNF α wird intrazellulär vorwiegend durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt, über welchen die Transkription weiterer proinflammatorischer Zytokine induziert wird (Schottelius et al. 2004).

Zusätzlich führt TNF α zu vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, sodass eine Interaktion mit Leukozyten stattfinden kann (Barker und Nickoloff 1992, Fantuzzi et al. 2008, Schön und Boehncke 2005). Auch *in vitro* ließ sich dieser Effekt von TNF α auf Endothelzellen nachweisen (Klein et al. 1995, Mako et al. 2010, Terajima et al. 1998). So steigt auf kultivierten Endothelzellen die Expression der drei Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 nach Stimulation mit TNF α deutlich an und kann bei Entzündungsprozessen eine Auswanderung von Lymphozyten in das Gewebe unterstützen (siehe auch 1.1.5) (Klein et al. 1995).

Da beide Rezeptortypen durch Abtrennen von der Membran als lösliche Rezeptoren vorkommen, können diese selbst als TNF α -Inhibitoren wirken, indem sie TNF α binden, welches dann nicht mehr über zellgebundene Rezeptoren wirken kann (Schottelius et al. 2004).

Neben den Funktionen, die TNF α über die Rezeptoren ausführt, besteht auch ein Effekt auf die TNF α -exprimierenden Zellen, wenn die Bindung mit einem TNF-R erfolgt (Fantuzzi et al. 2008, Horiuchi et al. 2010). Über diesen Mechanismus kann nach aktuellem Wissensstand die Lyse oder

eine Apoptose der TNF α -tragenden Zellen induziert werden (Fantuzzi et al. 2008, Horiuchi et al. 2010, Schottelius et al. 2004).

1.2.3 TNF α und Psoriasis

Der Erfolg der Anti-TNF α -Therapien in der Behandlung der Psoriasis belegt die wichtige Rolle dieses Zytokins deutlich (siehe 1.3.4) (Fantuzzi et al. 2008, Lowes et al. 2007, Nestle et al. 2009, Schön und Boehncke 2005). Übereinstimmend damit zeigt sich auch die Expression von TNF α im Rahmen der Psoriasis: Im Vergleich zu nicht-betroffener Haut der Psoriasis-Patienten und besonders zur Haut gesunder Menschen wird TNF α in Psoriasis-Läsionen überexprimiert (Ettehadi et al. 1994, Schottelius et al. 2004, Sjögren et al. 2012, Yao et al. 2008). Auch im Mausmodell lässt sich die Bedeutung von TNF α bei der Entwicklung psoriatischer Plaques nachweisen (Boyman et al. 2004). Zusätzlich ist TNF α nicht nur in der Haut, sondern auch in Monozyten aus dem Blut von Psoriasis-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht (Schottelius et al. 2004). TNF α hat im Rahmen der Pathogenese der Psoriasis verschiedene Funktionen (Fantuzzi et al. 2008). Zusammenfassend zählt dazu die pro-inflammatorische Wirkung durch Induktion sekundärer Zytokine sowie die Aktivierung der Monozyten und dendritischen Zellen (Fantuzzi et al. 2008, Schottelius et al. 2004), die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (siehe 1.2.2) und die damit verbundene verstärkte Einwanderung der Entzündungszellen in das betroffene Gewebe, welche ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Psoriasis ist (Fantuzzi et al. 2008).

1.3 Therapie der Psoriasis

1.3.1 Allgemeines zur Therapie

Die Behandlung der Psoriasis erfolgt je nach Schweregrad und individuellen Begleiterkrankungen als Lokalthherapie, Systemtherapie oder Kombination

von beidem (Nast et al. 2012). Die Therapieadhärenz (engl. *compliance*) der Patienten ist hierbei insgesamt eher gering, bis zu 40% der Patienten wenden die verordneten Medikamente nicht oder nicht ordnungsgemäß an (Nast et al. 2012). Hierfür werden verschiedene Faktoren wie fehlende Wirkung, Angst vor oder tatsächliches Auftreten von Nebenwirkungen, nicht ausreichende Information über mögliche Nebenwirkungen oder die komplizierte und aufwändige Durchführung der Behandlungen verantwortlich gemacht (Nast et al. 2012). Gerade bei Systemtherapien herrscht Unsicherheit über die Anwendung, vor allem bei niedergelassenen Ärzten, sodass oftmals selbst bei schwerer Psoriasis zu wenige Systemtherapien durchgeführt werden. Hinzu kommen Befürchtungen hinsichtlich finanzieller Regresse bei den oft teuren biologischen Therapien (Nast et al. 2012).

1.3.2 Lokalthherapie und Lichttherapie

In der aktuellen deutschen S3-Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris wird zur Behandlung der leichten chronischen Plaque-Psoriasis mit einem Psoriasis-Ausdehnungs-und-Schweregrads-Index (engl. *psoriasis area and severity index*; PASI) unter 10 sowie nach individueller Beurteilung auch der mittelschweren Psoriasis die alleinige Lokalthherapie empfohlen (Nast et al. 2012). Hierbei kommen Vitamin D3-Analoga, Dithranol oder Glukokortikosteroide zum Einsatz, welche modulierenden Einfluss auf die Keratinozytenfunktion und das Immunsystem haben (Nast et al. 2012, Schön und Boehncke 2005). Als weitere Therapiemöglichkeit steht die Lichttherapie zur Verfügung. Diese kann alleine oder in Kombination mit einigen topischen oder systemischen Therapien eingesetzt werden. Die Lichttherapie erfolgt entweder mit UV-B-Licht (besonders wirksam ist UV-B-Licht mit einer Wellenlänge von 311 nm) oder, nach vorheriger topischer oder systemischer Anwendung eines Photosensibilisators (Psoralen), mit UV-A-Licht (Honigsmann 2001, Schön und Boehncke 2005). Für die meisten Patienten ist die Behandlung mit lokalen Therapeutika ausreichend,

bei schwerer oder ausgedehnter Psoriasis sind jedoch systemische Medikamente erforderlich (Schön und Boehncke 2005).

1.3.3 Systemtherapie

Als eines der ersten Systemtherapeutika zur Behandlung der Psoriasis wurde Methotrexat benutzt, welches seit 1958 eingesetzt wird (Pathirana et al. 2009). Durch Inhibierung der DNA- und RNA-Synthese kommt es zu antiproliferativen und immunmodulatorischen Effekten (Pathirana et al. 2009). Weitere seit Jahren eingesetzte Medikamente sind Ciclosporin, Fumarsäureester und Retinoide (Acitretin) (Pathirana et al. 2009, Schön und Boehncke 2005). In der vergangenen Dekade wurde die Therapie der Psoriasis durch Einführung mehrerer Biologika entscheidend verbessert (Lowe et al. 2007). Biologika sind Antikörper oder andere Proteine, die selektiv bestimmte Zytokine oder T-Zell-Funktionen blockieren (Lowe et al. 2007). Gegenwärtig sind drei TNF α -Antagonisten (der chimäre Antikörper Infliximab, der humane Antikörper Adalimumab sowie das Fusionsprotein Etanercept) zur Therapie der Psoriasis vulgaris und der Psoriasis-Arthritis zugelassen (Nast et al. 2012). Ein weiterer TNF α -Antagonist (der humane Antikörper Golimumab) wurde zur Therapie der Psoriasis-Arthritis zugelassen (Boyce et al. 2010). Darüber hinaus kann der IL-12/IL-23 (p40)-Antagonist Ustekinumab zur Therapie der Psoriasis vulgaris und der Psoriasis-Arthritis eingesetzt werden (McInnes et al. 2013). Derzeit befinden sich mehrere weitere Biologika (beispielsweise gegen IL-17 gerichtete Präparate) oder kleinmolekulare Kinase-Inhibitoren in späten Phasen der klinischen Entwicklung und werden voraussichtlich bald zugelassen werden (Garcia-Perez et al. 2013, van den Berg und McInnes 2013). Schließlich ist mit dem Auslaufen des Patentschutzes für die ersten Biologika auch bald mit der Markteinführung so genannter „Biosimilars“ zu rechnen (Strober et al. 2011). Die früher eingesetzten Biologika Efalizumab und Alefacept sind nicht (mehr) zugelassen (Guhl et al. 2008, Talamonti et al. 2011). Eine sehr wichtige Zielstruktur für Biologika ist also TNF α , da es nach bisherigem

Wissenstand eine zentrale Rolle im inflammatorischen Geschehen bei der Psoriasis spielt (Schön und Boehncke 2005).

1.3.4 Anti-TNF α -Therapie

Unter den zur Therapie der Psoriasis in Deutschland zugelassenen Biologika gibt es drei, die sich gegen TNF α richten: Adalimumab, Etanercept und Infliximab (Nast et al. 2012). Adalimumab und Infliximab sind monoklonale Antikörper gegen TNF α , Etanercept ist ein löslicher TNF α -Rezeptor (Fantuzzi et al. 2008). Im Gegensatz zu dem chimären Antikörper Infliximab, bei welchem die konstante Sequenz humanen und die variable Sequenz murinen Ursprungs ist, ist Adalimumab vollständig human (Shim 2011). Infliximab wird intravenös verabreicht, Adalimumab und Etanercept werden hingegen subkutan injiziert (Schottelius et al. 2004). Alle drei binden sowohl lösliches als auch membrangebundenes TNF α , wobei die Affinität für lösliches TNF α höher ist (Horiuchi et al. 2010). Etanercept bindet zusätzlich an TNF β (Fantuzzi et al. 2008). Die Wirkung dieser drei Biologika beruht primär auf der Neutralisation des löslichen TNF α , sodass die TNF α -bedingten Effekte bei der Psoriasis aufgehoben werden (Schottelius et al. 2004). So kommt es zur Reduktion der IL-17- und IL-22-Spiegel im Serum (Caproni et al. 2009), zur Reduktion von Immunzellen in psoriatischen Plaques sowie zur Normalisierung der Keratinozyten-Differenzierung (Marble et al. 2007). Außerdem tritt eine verminderte Konzentration vom vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), welcher Angiogenese induziert, in psoriatischen Plaques auf (Campanati et al. 2012). Unter dem Einsatz der Anti-TNF α -Therapien bei der rheumatoiden Arthritis lässt sich eine Reduktion von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin im Serum und in der Synovia beobachten (den Broeder et al. 2002, Paleolog et al. 1996, Tak et al. 1996). Obwohl diese Anti-TNF α -Medikamente die gleiche Zielstruktur haben, gibt es einige Unterschiede in ihrer Wirksamkeit, dem Eintritt des therapeutischen Effekts und im Nebenwirkungsprofil (Fantuzzi et al. 2008,

Horiuchi et al. 2010, Schottelius et al. 2004). Dieses ist möglicherweise durch unterschiedliche Kinetik, Bindungsstellen an TNF α sowie Wirkungen auf membrangebundenes TNF α bedingt (Fantuzzi et al. 2008, Horiuchi et al. 2010). Über membrangebundenes TNF α können die drei Medikamente *in vitro* die Lyse der TNF α -tragenden Zelle durch Komplementaktivierung direkt induzieren sowie über Aktivierung natürlicher Killerzellen die Lyse der TNF α -tragenden Zelle herbeiführen, wobei zwischen den einzelnen Medikamenten Unterschiede im Ausmaß dieses Effekts bestehen (Horiuchi et al. 2010, Schottelius et al. 2004). Unter der Therapie mit Adalimumab, Infliximab oder Etanercept kann es zu verschiedenen Nebenwirkungen kommen, wobei besonders das Risiko für schwere Infektionen sowie für die Reaktivierung einer latenten Tuberkulose erhöht ist (Johnson-Huang et al. 2012, Schottelius et al. 2004).

1.4 Adalimumab

Adalimumab als vollständig humanes, gegen TNF α gerichtetes Immunglobulin G1 (IgG1) ist in Deutschland seit 2007 zur Behandlung der mittelschweren bis schweren Psoriasis vulgaris sowie seit 2005 zur Behandlung der Psoriasis-Arthritis zugelassen (Nast et al. 2012). Adalimumab ist außerdem zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis, der juvenilen idiopathischen Arthritis, der Spondylitis ankylosans und des Morbus Crohn zugelassen (Burmester et al. 2013).

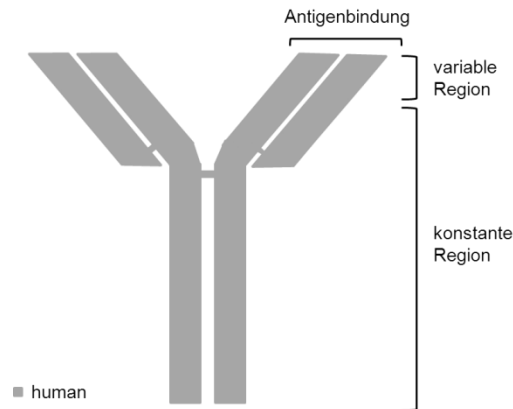


Abbildung 3: Adalimumab.

Adalimumab ist ein vollständig humaner Anti-TNF α -Antikörper.

Zur Therapie der Psoriasis wird Adalimumab alle zwei Wochen subkutan in einer Dosis von 40 mg verabreicht (Nast et al. 2012). Fünf Tage nach Injektion wird die maximale Serumkonzentration erreicht und die mittlere Gleichgewichts-Talkonzentration beträgt 5 $\mu\text{g/ml}$ (Traczewski und Rudnicka 2008). Die Wirkung wird, wie bei den anderen Anti-TNF α -Therapien auch, primär durch die Bindung an lösliches TNF α vermittelt, welches dann nicht mehr auf die TNF-Rezeptoren wirken kann (Traczewski und Rudnicka 2008). Dadurch kommt es zur Modulation TNF α -vermittelter Effekte, zum Beispiel der Expression von Adhäsionsmolekülen (Traczewski und Rudnicka 2008). Bis zum Erreichen erster therapeutischer Effekte dauert es etwa eine Woche nach der initialen Gabe (Gordon et al. 2006, Menter et al. 2008, Scheinfeld 2004).

Als Nebenwirkungen können Reaktionen an der Einstichstelle, Infektionen, insbesondere auch schwere, Reaktivierungen latenter Tuberkulose, allergische Reaktionen, Blutbildveränderungen und sehr selten Autoantikörperbildung sowie möglicherweise maligne Erkrankungen auftreten (Burmester et al. 2013, Pathirana et al. 2009, Scheinfeld 2005).

Obwohl 71-80% der Patienten durch Adalimumab nach 16 Wochen eine 75%ige Verbesserung des PASI erreichen, führt die Therapie bei einigen Patienten zu keinem ausreichenden Therapieerfolg („Non-Responder“) (Menter et al. 2008, Nast et al. 2012, Saurat et al. 2008).

Gerade in Anbetracht der möglichen Nebenwirkungen, aber auch der hohen Kosten der Therapie, wäre es von großem Vorteil, diejenigen Patienten, die nicht von dieser Therapie profitieren würden, bereits vor Beginn der Therapie identifizieren zu können. Es wurden zwar einige Unterschiede in Expressionsmustern verschiedener Genprodukte unter der Therapie beschrieben, die Aussagen dazu sind jedoch teilweise widersprüchlich, sodass sich bisher kein valider und prädiktiver Test zur Identifizierung möglicher „Non-Responder“ entwickelt hat (Johnson-Huang et al. 2012, Stuhlmüller et al. 2009, Toonen et al. 2012, Zaba et al. 2009). Auch die Bildung neutralisierender Antikörper gegen Adalimumab als Ursache für vermindertes Ansprechen auf die Therapie wird diskutiert. Obwohl bei einigen Patienten solche Antikörper nachgewiesen werden konnten, haben nicht alle „Non-Responder“ diese Antikörper (Bartelds et al. 2007, Bartelds et al. 2011). Es scheinen also noch weitere Faktoren eine große Rolle beim Ansprechen auf die Therapie zu spielen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Unterschiede im Ansprechen auf die Therapie auf der Ebene der Interaktion zwischen Endothelzellen und Lymphozyten begründet sein könnten. Da bisher keine Unterscheidung zwischen „Respondern“ und „Non-Respondern“ vor Beginn der Therapie möglich ist, könnten mögliche Unterschiede zwischen diesen beiden Patientengruppen in der Interaktion zwischen Endothelzellen und Lymphozyten die Grundlage zur Entwicklung eines prädiktiven und praktikablen Tests liefern. Dieses würde die Patienten, die nicht von der Therapie profitieren, vor unnötigen Risiken der Therapie, aber auch den hohen Kosten, bewahren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Absaugsystem VacuSafe comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Autoklav	Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japan
Brutschrank HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschrank HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Elektrophoresekammer Sub-Cell® GT	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
FACSCanto II	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Flusskammer	Individuelle Anfertigung
Gel Imager U:Genius	Syngene, Cambridge, UK
Heizblock Thermo Stat plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inverses Mikroskop, Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Isopropanol-Kryo-Container	Nalgene, Rochester, NY, USA
Kamera am Mikroskop (CoolSNAP ES)	Photometrics, Tucson, AZ, USA
Kühl- und Gefrierschränke +4; -20; -80°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop Axiovert 40 C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer Genesys 10 Bio	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Photometereinsatz TrayCell	Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Power Pack P25 (Spannungsquelle für die Elektrophorese)	Biometra, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Reinstwasserpumpe arium® 611VF	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttler	Grant-bio, Cambridge, UK
Spritzenpumpe SP100IZ	WPI, Sarasota, FL, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge Heraeus Pico17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortex Mixer L-46	Labinco, Breda, Niederlande
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wecker	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturbank BDK	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Zellkulturbank HERAsafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Multifuge 1S-R Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Rotina 35	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Adapter zur Blutentnahme	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Chamber Slides für die Immunfluoreszenz	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Coverslips für die Flusskammer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Eppendorf-Gefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen 5 ml	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon-Röhrchen 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Glaspipetten 150 mm	WU, Mainz, Deutschland
Kanüle Microlance 3	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
PCR-Cups	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischalen 100 x 20 mm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter Tips für PCR	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safety-Multifly-Set zur Blutentnahme	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 5 ml; 10 ml; 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritze 1 ml	B.Braun, Melsungen, Deutschland

Spritze 20 ml	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturflaschen 25 cm ² ; 75 cm ²	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

2.1.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 3: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssysteme	Bezugsquelle
E.Z.N.A.™ Total RNA Kit I	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St- Leon-Rot, Deutschland
Taq DNA Polymerase all inclusive	Peqlab, Erlangen, Deutschland
RNase-Free DNase I Set	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA
Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Alkoholisches Hautantiseptikum	Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CFDA-SE	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGM™ Single Quots® zur Herstellung des Endothelial Cell Growth Mediums	Lonza, Basel, Schweiz
Einfriermedium Cryo-SFM für Zellen in Kultur	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Basal Medium	Lonza, Basel, Schweiz
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
GelRed™	Biotium, Hayward, CA, USA
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Heparin	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Humanes AB-Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
PBS	PAA, Pasching, Österreich
RPMI-1640	PAA, Pasching, Österreich
Supplement Mix für Endothelial Cell Growth Medium von PromoCell	Promocell, Heidelberg, Deutschland
TNF α	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% in PBS	PAA, Pasching, Österreich
Türks-Lösung zur Leukozytenfärbung	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Bezeichnung des Antikörpers	Ursprungsspezies und Isotyp	Zielspezies	Hersteller
Adalimumab	Phagen-Display, IgG1	Mensch	Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA
Anti-CD 106, nicht gelabeled	Maus, IgG1	Mensch	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Anti-CD 14 FITC	Maus, IgG	Mensch	Medac, Wedel, Deutschland
Anti-CD 19 PE	Maus, IgG	Mensch	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-CD 3 FITC	Maus, IgG	Mensch	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-CD 54 FITC	Maus, IgG1	Mensch	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Anti-CD 62E PE	Maus, IgG1	Mensch	Antibodies-online, Aachen, Deutschland
Humaner IgG1-Isotyp	Mensch, IgG1		Enzo, Farmingdale, NY, USA
Humaner IgG-Isotyp	Mensch, IgG		Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
Muriner FITC-Isotyp	Maus, IgG1		Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Muriner Isotyp, nicht konjugiert	Maus, IgG1		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Muriner PE-Isotyp	Maus, IgG1		Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Sekundäantikörper anti-Maus IgG Alexa Fluor 488	Ziege	Maus	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

Sekundärantikörper anti-Maus IgG Alexa Fluor 555	Esel	Maus	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
--------------------------------------------------------	------	------	-------------------------------

2.1.6 Zellen

Tabelle 6: Zellen

Zellen	Bezugsquelle
HUVEC (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)	Lonza, Basel, Schweiz
HUVEC (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland

2.1.7 Puffer/Lösungen/Medium

Blockinglösung (Immunfluoreszenz)	50 µl FCS 950 µl PBS
Antikörpergrundlösung (Immunfluoreszenz)	25 µl FCS 975 µl PBS
Doppeltes Einfriermedium	DMSO (20%) FCS (40%) RPMI (40%)
10-fach TBE-Puffer	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 1000 ml Aqua bidest.
Nährmedium (Growth Medium)	500 ml Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell) oder 500 ml Endothelial Cell Growth Medium (Lonza), mit den jeweils zugehörigen Zusätzen versetzt
Basalmedium	500 ml Basalmedium (PromoCell bzw. Lonza) 50 ml FCS (Fetales Kälberserum)

2.1.8 Software

Tabelle 7: Software

Software	Bezugsquelle
AxioVision Rel 4.7	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
FACS Diva Software	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
MetaMorph 6.3r2	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Microsoft Office 2007 und 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
SAS version 9.3	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur- Methoden

2.2.1.1 HUVEC

HUVEC (engl. *human umbilical vein endothelial cells*) sind humane Endothelzellen, welche aus Nabelschnurvenen isoliert und anschließend kultiviert werden. HUVEC exprimieren nach TNF α -Stimulation E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 auf ihrer Oberfläche und können damit sowohl das Rollen als auch die feste Adhäsion von Leukozyten unterstützen (Oostingh et al. 2007).

2.2.1.2 Kultivierung von HUVEC

HUVEC wurden bei 37°C und 5% CO₂ unter sterilen Bedingungen im Inkubator kultiviert. Die Versuchsreihen zur Untersuchung der peripheren Blut-Monozyten (PBMC) freiwilliger Probanden im Hinblick auf die Stimulierbarkeit durch TNF α (siehe 3.1) sowie die Versuche zum Einfrieren der Lymphozyten (siehe 3.2) wurden mit HUVEC von PromoCell durchgeführt, für die weiteren Experimente wurde dann zu HUVEC der Firma Lonza gewechselt. Zur Kultivierung der HUVEC wurden 15 ml warmes (37°C) Nährmedium (engl. *Endothelial Cell Growth Medium*), versetzt mit den zugehörigen Zusätzen, zu den Zellen in die Kulturflaschen gegeben. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Wechsel des Nährmediums.

Die Zellen wurden kultiviert, bis sie 90% des Kulturflaschenbodens bedeckten (90% Konfluenz). Wenn dies der Fall war, wurden die Zellen passagiert, eingefroren oder ausgesät. Jeweils mindestens 4 h vor den Versuchen wurde den Zellen das Nährmedium entzogen und durch Basalmedium ersetzt. Die Arbeiten mit den Zellen erfolgten unter der Sterilbank zum Schutz der Zellen vor Verunreinigungen und Kontaminationen.

2.2.1.3 Passagieren von adhärennten Zellen

Zum Ablösen der Zellen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden verwendet. In den Versuchen zur Interaktion zwischen PBMC gesunder Probanden und TNF α -stimulierten Endothelzellen sowie den Versuchsreihen zum Einfrieren der Lymphozyten (siehe 3.1 und 3.2) wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, bei den späteren Versuchen wurde dafür Accutase verwendet.

Sobald die Zellen zu 90% konfluent waren, wurden sie in neue Kulturflaschen aufgeteilt. Das Medium wurde hierfür mit einer sterilen Einmalpipette abgesaugt. Die Zellen wurden vorsichtig mit 3 ml oder 8 ml (je nach Größe der Kulturflaschen) PBS (37°C) gewaschen. Dann wurden 3 ml (75 cm²-Flasche) oder 1 ml (25 cm²-Flasche) Trypsin/EDTA oder Accutase zugegeben.

Wurde Trypsin/EDTA verwendet, erfolgte die Inkubation für 2 min im Brutschrank. Die Zellen wurden dabei vom Boden der Flasche abgelöst. Anschließend wurden 3 ml PBS mit 100 μ l FCS (jeweils 37°C) auf die Zellen gegeben, um die Enzymaktivität zu stoppen. Der Inhalt der Flasche wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zell-Sediment in 5 ml warmem Nährmedium resuspendiert, auf neue Zellkulturflaschen (75 cm²) aufgeteilt und mit weiteren 10 ml Nährmedium versetzt.

Wenn Accutase verwendet wurde, wurden die Zellen zwischen 5 und 15 min bei 37°C damit inkubiert. Da die Accutase sich selbst verdaut,

brauchte der Ablösevorgang nicht abgestoppt zu werden und es konnte direkt Nährmedium zu den Zellen gegeben und diese auf neue Flaschen verteilt werden. Sollten die Zellen für die Versuche mit einer bestimmten Zellzahl ausgesät werden, erfolgte im Anschluss an das Ablösen der Zellen eine Zentrifugation für 5 min bei 250 x g. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 1 ml Medium aufgenommen, die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die gewünschte Anzahl Zellen ausgesät.

Die Zahl der Zellen war jeweils abhängig von der Teilungsrate und dem gewünschten Zeitpunkt der Weiterverarbeitung.

2.2.1.4 HUVEC einfrieren und auftauen

Um die HUVEC länger zu konservieren, wurden diese in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Dabei wurden die zu 90% konfluenten Zellen zunächst wie beim Passagieren behandelt (siehe 2.2.1.3). Nach der Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen jedoch in 1 ml Cryo-SFM resuspendiert und in Einfrierröhrchen aliquotiert. Dann wurden die Zellen für mindestens 12 h bei -80°C in einem Isopropanol-Kryo-Container eingefroren. Durch das Isopropanol kühlen die Zellen mit ungefähr 1°C pro Minute langsam ab. Wenn die Zellen in den Einfrierröhrchen im Anschluss in Flüssigstickstoff gegeben werden, können sie so für lange Zeit aufbewahrt werden.

Zum Auftauen wurden die kryokonservierten HUVEC auf 37°C im Wasserbad erwärmt und in eine Kulturflasche mit 15 ml warmem (37°C) Nährmedium gegeben. Nach 6-8 h im Inkubator (37°C, 5% CO₂) erfolgte jeweils ein Mediumwechsel, da das Dimethylsulfoxid (DMSO) aus dem Einfriermedium toxisch wirkt. Nun erfolgte die Kultivierung wie bereits beschrieben.

2.2.1.5 Aussäen adhärenter HUVEC für Flusskammerversuche, PCR oder Immunfluoreszenz

Für die Flusskammerversuche wurden die Zellen auf Objektträgern („Coverslips“ für die Flusskammer) ausgesät. Hierzu wurde ebenso verfahren wie beim Passagieren der Zellen (siehe 2.2.1.3), jedoch wurden die HUVEC nach der Zentrifugation in 1 ml Nährmedium aufgenommen und auf 10^5 Zellen/ml eingestellt. Auf jeden Objektträger (in einer Petrischale) wurden vorsichtig 10^5 Zellen (1 ml) ausgesät. Nach 4-6 h erfolgte die Zugabe von weiteren 7 ml Nährmedium je Objektträger. Nach weiteren 24 h wurde das Nährmedium entfernt und 8 ml Basalmedium mit 10% FCS für weitere 18 h zugegeben.

Die für die Immunfluoreszenz verwendeten HUVEC wurden wie die HUVEC für die Flusskammerversuche behandelt, allerdings wurden die Zellen auf $0,6 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt und in jede Kammer der gekammerten Objektträger wurden $0,3 \cdot 10^5$ Zellen (500 μ l) ausgesät. Vier Stunden vor Behandlung der Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt und je Kammer wurden vorsichtig 500 μ l Basalmedium mit 10% FCS zugegeben.

Für die PCR wurden die HUVEC in 25 cm²-Flaschen ausgesät. Es wurde genauso vorgegangen wie beim Passagieren der Zellen (siehe 2.2.1.3), jedoch wurden die in Nährmedium aufgenommenen HUVEC in 25 cm²-Flaschen ausgesät und kultiviert, bis sie zu 90% konfluent waren. Dann wurde das Nährmedium abgesaugt und jeweils 5 ml Basalmedium mit 10% FCS für 4 h zugegeben.

2.2.2 Präparation der PBMC

2.2.2.1 Gesunde Probanden und Psoriasis-Patienten

Für die Durchflusszytometrie wurden periphere Blut-Monozyten (PBMC) gesunder Probanden verwendet; für die Flusskammerversuche wurden zusätzlich PBMC von Psoriasis-Patienten eingesetzt. Die Experimente mit humanen Zellen wurden durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (Antragsnummer

24/3/09). Die venöse Blutentnahme erfolgte durch einen approbierten Arzt beziehungsweise eine approbierte Ärztin nach ausführlicher Aufklärung und Zustimmung.

Von den zehn gesunden Probanden wurden für die Flusskammerexperimente bezüglich der inter-individuellen Unterschiede nach TNF α -Aktivierung jeweils zwischen 15 ml und 150 ml venöses Blut abgenommen. Die zehn gesunden Probanden waren zwischen 22 und 28 Jahre alt und setzten sich aus sieben weiblichen Nichtraucher, zwei männlichen Nichtrauchern und einem männlichen Raucher zusammen. Zusätzlich wurde für die Untersuchung der Eigenschaften der PBMC vor und nach Kryokonservierung venöses Blut von vier dieser Probanden für durchflusszytometrische Experimente, sowie Blut von fünf der gesunden Probanden für Flusskammerversuche verwendet. Für die Flusskammerversuche bezüglich des Einflusses von Adalimumab auf Endothelzellen in der Interaktion mit PBMC wurde ebenfalls venöses Blut von vier der zehn freiwilligen Probanden verwendet. Diese vier Probanden waren zwischen 22 und 28 Jahre alte Nichtraucherinnen.

Außerdem wurden von insgesamt zehn Psoriasis-Patienten zwischen 20 und 40 ml Blut abgenommen. Alle Psoriasis-Patienten hatten eine mittelschwere bis schwere Psoriasis mit einem PASI (Psoriasis-Ausdehnungs- und Schweregrads-Index) von über 10 vor Beginn der Adalimumab-Therapie. Bei fünf der Psoriasis-Patienten, den „Respondern“, trat eine deutliche Besserung des PASI (um mindestens 75%) unter der Therapie mit Adalimumab (40 mg alle 2 Wochen subkutan injiziert) auf. Die anderen fünf Psoriasis-Patienten, die „Non-Responder“, zeigten keine deutliche Besserung unter dem gleichen Therapieregime mit Adalimumab, sodass auch unter der Therapie der PASI über 10 war. Vor Beginn der Therapie mit Adalimumab waren die PASI-Werte zwischen beiden Gruppen vergleichbar und betragen bei den „Respondern“ zwischen 10,2 und 26,4 (durchschnittlich 14,7) sowie bei den „Non-Respondern“ zwischen 10,5 und 19,0 (durchschnittlich 14,26). Die „Responder“ waren zwischen 32 und 54

Jahre alt und setzten sich aus zwei männlichen Rauchern, zwei männlichen Nichtrauchern und einer weiblichen Nichtraucherin zusammen. Die Gruppe der „Non-Responder“ bestand aus einem männlichen und zwei weiblichen Rauchern sowie zwei männlichen Nichtrauchern, die zwischen 37 und 65 Jahre alt waren.

2.2.2.2 Lymphozytenisolierung aus peripherem venösen Blut

Für die Flusskammerversuche und die Durchflusszytometrie verwendete PBMC (periphere Blut-Monozyten) wurden mittels eines Ficoll-Dichtegradienten isoliert.

Dazu wurde venöses Blut mit dem gleichen Volumen HBSS vermischt und vorsichtig auf das Ficoll-Paque Plus® geschichtet. Nach Zentrifugation mit 400 x g für 30 min bei Raumtemperatur erhielt man einen Gradienten.

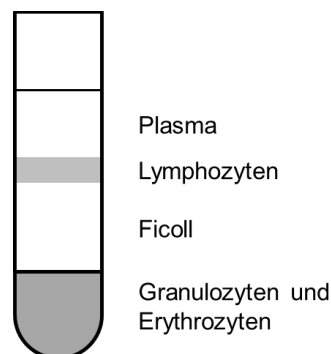


Abbildung 4: Ficoll-Gradient nach Zentrifugation.

In der mittleren trüben Scheibe befinden sich die Lymphozyten.

In der mittleren Schicht befinden sich die Lymphozyten. Diese wurden vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und anschließend bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zell-Sediment wurde nun entweder direkt mit CFDA-SE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) gefärbt und im Flusskammerversuch eingesetzt, ungefärbt im Durchflusszytometer analysiert oder eingefroren. Das Einfrieren erfolgte für Flusskammer-

versuche entweder vor oder nach Färbung mit CFDA-SE, für durchflusszytometrische Analysen jedoch immer ungefärbt.

2.2.2.3 CFDA-SE-Färbung

Für die Flusskammerversuche wurden die Zellen mit CFDA-SE gefärbt. Diese Substanz hat selbst keine fluoreszierenden Eigenschaften, ist sehr lipophil und kann somit leicht durch die Zellmembran diffundieren. In der Zelle werden die Acetatgruppen durch Esterasen abgespalten, so dass CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) entsteht, welches deutlich weniger membrangängig ist. Nach dieser Umwandlung zum CFSE wird das Molekül fluoreszierend. Zusätzlich bindet es noch kovalent an Aminogruppen. Dadurch bleibt es Wochen bis Monate stabil in den Zellen und wird nicht mehr an andere Zellen abgegeben (Parish 1999).

Die Färbung in den Versuchen erfolgte sowohl bei frisch isolierten Zellen als auch bei aufgetauten Zellen identisch. Dabei wurde nach dem Versuchsprotokoll der Herstellerfirma vorgegangen. CFDA-SE wurde in einer Endkonzentration von 5 μM in warmem (37°C) HBSS zu den Zellen gegeben. Die 15-minütige Inkubationszeit bei 37°C ermöglichte die Aufnahme des Farbstoffs in die Zellen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 200 x g für 10 min pelletiert und in vorgewärmtem (37°C) HBSS resuspendiert. Während einer weiteren 30-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte die oben beschriebene Modifikation des Farbstoffes. Nun wurde erneut eine Zentrifugation bei 200 x g für 10 min durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Zellen erneut in HBSS resuspendiert und zentrifugiert, um den verbliebenen freien Farbstoff auszuwaschen.

Die gefärbten PBMC wurden nach Entfernung des Überstandes entweder eingefroren (siehe 2.2.2.4) oder mit HBSS auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und mit CaCl_2 in einer Endkonzentration von 2 mM versetzt.

Anschließend wurden die PBMC vor Licht geschützt auf Eis gestellt und innerhalb von 5 h für die Flusskammerversuche verwendet.

2.2.2.4 PBMC einfrieren

Das Sediment mit den CFDA-SE-gefärbten oder ungefärbten PBMC (siehe 2.2.2.2 und 2.2.2.3) wurde in 20 ml HBSS resuspendiert und nochmals bei 100 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die sedimentierten Zellen in 500 µl RPMI gelöst und nach Zugabe von 500 µl doppelt konzentriertem Einfriermedium sofort in ein Einfrierröhrchen überführt und im Isopropanol-Tank bei -80°C über mindestens 12 h langsam heruntergekühlt. Im Anschluss wurde das Einfrierröhrchen mit den PBMC im Stickstofftank (-196°C) gelagert.

2.2.2.5 PBMC auftauen

Die in flüssigem Stickstoff kryokonservierten PBMC wurden im Wasserbad zügig auf 37°C erwärmt, in 10 ml RPMI suspendiert und bei 250 x g in der Zentrifuge pelletiert, ein zweites Mal in RPMI suspendiert und zentrifugiert, um das DMSO möglichst vollständig herauszuwaschen. Das entstandene Pellet wurde nun in Abhängigkeit von der weiteren Verwendung entweder für die Flusskammerversuche mit HBSS auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und mit CaCl_2 in einer Endkonzentration von 2 mM versetzt oder für die durchflusszytometrischen Analysen wie unter 2.2.4 beschrieben behandelt.

Ungefärbt kryokonservierte PBMC, welche für die Flusskammerversuche verwendet werden sollten, wurden nach dem Auftauen nach dem oben beschriebenen Protokoll mit CFDA-SE gefärbt (siehe 2.2.2.3).

2.2.3 Flusskammerversuche

2.2.3.1 Prinzip der Flusskammer

Mit Hilfe der Flusskammer werden die physiologischen Bedingungen des Blutstroms in den Gefäßen modelliert, wodurch die Untersuchung der Interaktion zwischen Endothelzellen und Blutzellen ermöglicht wird. Insbesondere das Rollen und die feste Adhäsion als Ausdruck der Interaktion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen lassen sich in der Flusskammer analysieren. Die Flusskammer besteht aus einem Quader aus

Acryl, der an der Unterseite eine 50 μm tiefe, 3,5 cm lange und 0,5 cm breite Aussparung besitzt, welche über je ein Röhrchen mit dem Zufuhr- und dem Abflussschlauch verbunden ist. Unter die Aussparung wird ein mit Endothelzellen beschichteter Objektträger mit der beschichteten Seite in Richtung des Acrylquaders angebracht. Mittels zweier Schrauben wird alles in einem Metallgestell fixiert. Wird nun die Lymphozytensuspension durch den Zufuhrschlauch geleitet, gelangt diese durch das Zufuhrrohrchen in den Bereich der Aussparung im Acrylquader und fließt dort mit einer konstanten Geschwindigkeit in annähernd laminarer Strömung über die Endothelzellschicht auf dem Objektträger, sodass die Interaktion zwischen Endothelzellen und Lymphozyten stattfinden kann. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops lässt sich das Verhalten der fluoreszenzmarkierten Lymphozyten beobachten.

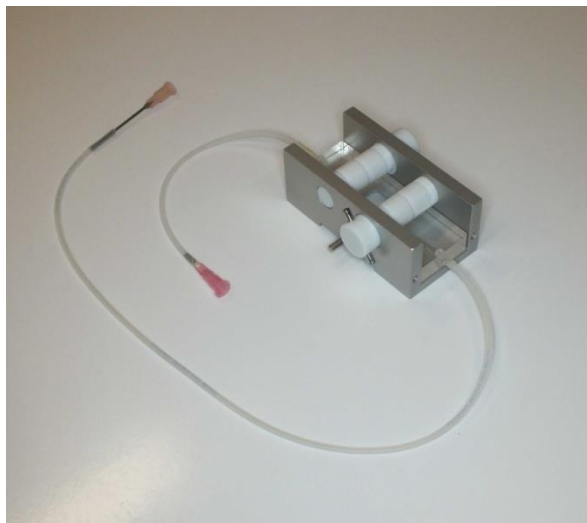


Abbildung 5: Flusskammer.

An der linken Seite befindet sich der Zufuhrschlauch, durch den die Lymphozyten über das Zufuhrrohrchen in die Kammer gelangen. An der Oberseite des Acrylquaders, welcher in das Metallgestell mit Hilfe der Plastikschrauben eingespannt ist, gibt es eine 50 μm tiefe Aussparung, auf der der Objektträger mit den HUVEC aufgelegt wird. Fließen die Lymphozyten durch diese Aussparung, können sie dort mit den HUVEC interagieren. Durch ein Mikroskop kann dieses in der Mitte der Kammer beobachtet werden. Durch das Abflussrohrchen und den Abflussschlauch auf der rechten Seite der Abbildung gelangen die Lymphozyten wieder aus der Kammer.

2.2.3.2 Vorbereitung des Flusskammerexperiments

Die auf Objektträgern ausgesäten und zu 90% konfluenten HUVEC wurden nach Wechsel auf Basalmedium zu verschiedenen Zeitpunkten mit Adalimumab in verschiedenen Konzentrationen behandelt, wie unten aufgelistet. Jeweils 4 h vor Versuchsbeginn wurde TNF α in einer Endkonzentration von 25 ng/ml dazugegeben. Als Kontrollen dienten je nach Versuchsreihe unbehandelte HUVEC, nur mit TNF α stimulierte HUVEC, nur mit Adalimumab behandelte HUVEC und HUVEC, die mit einer Isotypkontrolle für Adalimumab und TNF α zusammen inkubiert wurden.

Ansätze für die Adalimumab Zeit- und Konzentrationsreihen:

- | | |
|--------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1) kein Adalimumab | unstimuliert |
| 2) kein Adalimumab | TNF α 25 ng/ml |
| 3) Adalimumab 0,5 μ g/ml | TNF α 25 ng/ml |
| 4) Adalimumab 1 μ g/ml | TNF α 25 ng/ml |
| 5) Adalimumab 5 μ g/ml | TNF α 25 ng/ml |
| 6) Adalimumab 25 μ g/ml | TNF α 25 ng/ml |
| 7) Adalimumab 50 μ g/ml | TNF α 25 ng/ml |
| 8) Adalimumab 1 μ g/ml | unstimuliert |
| 9) IgG-Isotypkontrolle 50 μ g/ml oder 1 μ g/ml | TNF α 25 ng/ml |

TNF α wurde jeweils 4 h vor Versuchsbeginn zugegeben. Adalimumab und die IgG-Isotypkontrolle wurden in verschiedenen Versuchsreihen zu verschiedenen Zeitpunkten zugegeben, wobei innerhalb eines Versuchs jeweils der gleiche Zeitpunkt verwendet wurde. Für jeden der folgenden Zeitpunkte wurden alle oben genannten Ansätze untersucht:

- a) Adalimumab-Behandlung 5 h vor TNF α -Gabe (-5h)
- b) Adalimumab-Behandlung 1 h vor TNF α -Gabe (-1h)
- c) Adalimumab-Behandlung gleichzeitig mit TNF α -Gabe (0h)
- d) Adalimumab-Behandlung 2 h nach TNF α -Gabe (+2h)
- e) Adalimumab-Behandlung 3½ h nach TNF α -Gabe (+3,5h)

Ansätze für die Versuche mit Psoriasis-Patienten („Responder“ und „Non-Responder“):

- | | |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1) kein Adalimumab | unstimuliert |
| 2) kein Adalimumab | TNF α 25 ng/ml |
| 3) Adalimumab 5 μ g/ml, 1 h vor TNF α -Gabe | TNF α 25 ng/ml |
| 4) Adalimumab 5 μ g/ml, gleichzeitig mit TNF α -Gabe | TNF α 25 ng/ml |
| 5) Adalimumab 5 μ g/ml, 2 h nach TNF α -Gabe | TNF α 25 ng/ml |
| 6) Adalimumab 5 μ g/ml, 1 h vor TNF α -Gabe | unstimuliert |
| 7) IgG-Isotypkontrolle 5 μ g/ml, 1 h vor TNF α -Gabe | TNF α 25 ng/ml |

TNF α wurde jeweils 4 h vor Versuchsbeginn hinzugegeben.

In den Flusskammerversuchen wurde der Ansatz 2) jeweils zweimal pro Versuch durchgeführt, jeweils einmal zu Beginn und einmal am Ende des Versuchs, um zu überprüfen, dass die Interaktion nach Stimulation mit zunehmender Versuchsdauer nicht deutlich nachlässt.

2.2.3.3 Durchführung der Flusskammerexperimente

Die aufgetauten oder frischen mit CFDA-SE gefärbten PBMC wurden in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ /ml eingesetzt und während der Flusskammerversuche auf Eis gehalten. Für die Versuche mit den Zeit- und Konzentrationsreihen sowie für die Versuche mit den Zellen der Psoriasis-Patienten wurden ausschließlich kryokonservierte PBMC verwendet, welche bereits vor dem Einfrieren mit CFSE gefärbt wurden. Jeweils ein mit den

behandelten HUVEC beschichteter Objektträger wurde in die Flusskammer eingespannt. Wichtig ist hierbei, dass im gesamten System keine Luftblasen sind, da diese die laminare Strömung stören würden. Mit Hilfe der Spritzenpumpe wurde ein gleichmäßiger Fluss der Lymphozytensuspension mit einer Geschwindigkeit von 1,12 ml/h durch den zuführenden Schlauch und durch die Flusskammer erzeugt. Nach jedem Wechsel des Objektträgers wurden der Schlauch und die Flusskammer mit Waschpuffer durchgespült. Durch das inverse Fluoreszenzmikroskop wurden die mit CFSE markierten Lymphozyten unter Einsatz des Filters mit zugehöriger Wellenlänge mikroskopisch beobachtet. Sobald die ersten Lymphozyten durch die Flusskammer flossen und im Mikroskop sichtbar wurden, wurden zehn Minuten lang sämtliche rollende Lymphozyten in einem standardisierten Gesichtsfeld bei 160-facher Vergrößerung ausgezählt. Hierfür wurde das Gesichtsfeld über die Kamera auf den Computerbildschirm übertragen und im Programm MetaMorph dargestellt. Nach Ablauf der 10 min wurden 16 standardisierte Gesichtsfelder mit Hilfe des Programms MetaMorph bei einer 160-fachen oder 80-fachen Vergrößerung aufgenommen und im Anschluss in diesen Gesichtsfeldern unter Verwendung des Programms ImageJ alle fest haftenden Lymphozyten gezählt.

			5				13			
	1	4			9	12				
			6	8			14	16		
	2	3			10	11				
				7				15		

Abbildung 6: Auswahl der Gesichtsfelder für die feste Adhäsion.

Der gesamte Bereich der Flusskammer wurde bei einer 80-fachen Vergrößerung in 55 Gesichtsfelder aufgeteilt. Von diesen wurden 16 standardisierte Gesichtsfelder in der Reihenfolge der Nummerierung aufgenommen und die fest haftenden Zellen ausgezählt.

2.2.4 Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence activated cell sorting*: FACS)

2.2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen nach Größe und Granularität, indem die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und durch einen Laserstrahl geleitet werden. Durch die Streuung des Laserlichts wird einerseits die Größe des Zelle (Vorwärtsstreulicht, engl. *forward scatter*, FSC), andererseits die Granularität (Seitwärtsstreulicht, engl. *side scatter*, SSC) erfasst. Werden nun zusätzlich fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen spezifische Antigene auf den Zellen verwendet, werden diese beim Passieren des Laserlichts zur Emission bestimmter Wellenlängen angeregt und können durch Detektoren gemessen werden.

2.2.4.2 Durchführung der Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden jeweils frische oder kryokonservierte PBMC verwendet, die nicht mit CFSE markiert worden sind. Von diesen wurden jeweils 5 Ansätze mit je 10^5 Zellen hergestellt. Jeder Ansatz wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml PBS gewaschen. Nachdem die Zellen 5 min bei 300 x g zentrifugiert wurden, wurde der Überstand verworfen und 5 µl humanes AB-Serum hinzugegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend wurde in je ein FACS-Röhrchen einer der folgenden Antikörper gegeben und 15 min bei 4°C inkubiert:

- 1) Anti-CD14 FITC
- 2) Anti-CD19 PE
- 3) Anti-CD3 FITC
- 4) Muriner PE-Isotyp
- 5) Muriner FITC-Isotyp

Im Anschluss wurde mit 1 ml PBS gewaschen und die Zellen wurden bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die sedimentierten Zellen in jeweils 250 µl PBS suspendiert. Im FACSCanto II wurde der jeweilige Anteil der Zellen, die das jeweils markierte Oberflächenprotein exprimierten, bestimmt und mit Hilfe der FACS Diva Software ausgewertet. Die Isotyp-Antikörper dienten hierbei als Kontrollen.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*: PCR)

2.2.5.1 RNA-Isolierung mit DNase-Verdau (Probengewinnung für die Polymerase-Kettenreaktion)

Um die Wirkung von Adalimumab auf die Transkription der Gene verschiedener Adhäsionsmoleküle in HUVEC zu untersuchen, wurde die mRNA isoliert, in DNA umgeschrieben (revers transkribiert) und die Sequenz, die das jeweilige Adhäsionsmolekül codiert, mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die relative Menge des entstandenen Produkts wurde nach Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Die HUVEC wurden, nachdem das Kulturmedium 4 h zuvor auf Basalmedium gewechselt worden war, hierfür mit Adalimumab in verschiedenen Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten behandelt. Zusätzlich erfolgte die Stimulation mit TNF α in einer Konzentration von 25 ng/ml jeweils 4 h vor Versuchsbeginn, das heißt vor Isolierung der mRNA. Die Behandlung der Zellen erfolgte genauso wie bereits für die Flusskammerversuche beschrieben (siehe „Ansätze für die Zeit- und Konzentrationsreihen“ unter 2.2.3.2). Für die mRNA-Isolierung wurde das Medium von den Zellen vorsichtig abgezogen und die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS mit Accutase vom Kulturflaschenboden abgelöst. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 250 x g für 5 min pelletiert und die RNA anschließend mit dem E.Z.N.A.TM Total RNA Kit nach dem vorgegebenen Protokoll isoliert. Hierbei wurde das

Protokoll mit gleichzeitigem DNase-Verdau verwendet, für den das RNase-Free DNase Set von Omega verwendet wurde:

Die pelletierten Zellen wurden in je 350 µl TRK-Lyse-Puffer gelöst, der zuvor mit 2% vol. 2-Mercaptoethanol versetzt wurde, und durch Auf- und Abpipettieren sorgfältig homogenisiert. Zu den gelösten Zellen wurden jeweils 350 µl 70%-iger Ethanol zugegeben und gut gemischt. Das so gewonnene Lysat wurde auf eine Säule pipettiert, die in einem Reaktionsgefäß platziert für 60 sec bei 10.000 x g zentrifugiert wurde. Hierbei bindet die mRNA an eine Silika-Gel-Membran in der Säule. Durch Zugabe von 350 µl Waschpuffer I auf die Säule und erneute Zentrifugation bei 10.000 x g für 60 sec wurden die nicht-gebundenen Bestandteile herausgewaschen. Anschließend erfolgte der DNase-Verdau, indem je Säule 75 µl DNase-Verdau-Lösung, bestehend aus je 73,5 µl DNase-Verdau-Puffer und 1,5 µl RNase freier DNase, zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Danach wurden jeweils 400 µl Waschpuffer I zu jeder Säule gegeben, diese 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss bei 10.000 x g für 60 sec zentrifugiert. Nun wurden jeweils 500 µl Waschpuffer II auf die Säulen gegeben und diese bei 10.000 x g für 60 sec zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Um die Flüssigkeit möglichst vollständig aus der Säule zu entfernen, wurde die Säule ohne Zugabe einer Lösung bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert. Nach der Entfernung der Verunreinigungen durch die verschiedenen Waschschrte wurde die mRNA im letzten Schritt wieder von der Säule gelöst. Hierfür wurden die Säulen in je einem 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert, auf die Säulen jeweils 40 µl DEPC-Wasser gegeben und zunächst 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule bei maximaler Geschwindigkeit 2 min zentrifugiert, sodass die mRNA von der Säule gelöst und in das Reaktionsgefäß eluiert wurde. Die mRNA wurde nun entweder sofort in cDNA umgeschrieben oder zunächst bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5.2 Vorbereitung der reversen Transkription: Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts

Als reverse Transkription bezeichnet man die Synthese der komplementären DNA zur mRNA. Diese Reaktion wird durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase katalysiert. Das Ergebnis ist die sogenannte cDNA (engl. *complementary DNA*).

Da für diese Reaktion jeweils 1 µg mRNA eingesetzt wurde, musste zunächst eine Konzentrationsbestimmung der in der Isolierung gewonnenen RNA erfolgen. Hierfür wurde der RNA-Gehalt der Proben mit Hilfe des Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, um mögliche Verunreinigungen durch Proteine zu bestimmen. Der Quotient der gemessenen optischen Dichte bei 260 nm und bei 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Aufgrund der RNA-Konzentrationsmessung konnte nun das Volumen bestimmt werden, welches jeweils 1 µg RNA enthält. Dieses wurde mit nukleasefreiem Wasser (im First Strand cDNA Synthesis Kit enthalten) auf 10 µl aufgefüllt und in die reverse Transkription eingesetzt.

2.2.5.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit. Dafür wurden die 10 µl-Proben, die jeweils 1 µg RNA enthielten, mit 1 µl Oligo(dT)₁₈ Primer gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend 5 min bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese jeweils nochmals kurz zentrifugiert, bevor zu jeder Probe folgende Substanzen pipettiert wurden:

5 x Reaktionspuffer	4 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor	1 µl
Reverse Transkriptase	2 µl

Diese Versuchsansätze wurden im Anschluss bei 37°C für 60 min inkubiert. Zuletzt wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Die entstandene cDNA wurde nun entweder sofort in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

2.2.5.4 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Hierfür werden in mehreren Zyklen jeweils bestimmte Reaktionsschritte wiederholt, wobei in jedem Zyklus die vorhandenen DNA-Stränge verdoppelt werden und jeweils wieder als Vorlage für die Bildung neuer DNA-Stränge dienen, sodass die Vervielfältigung exponentiell erfolgt. Als erster Schritt in jedem Zyklus erfolgt die Denaturierung. Hierbei werden durch Erhitzen auf eine Temperatur von etwa 94°C die komplementären Stränge der Doppelstrang-DNA in die zwei einzelnen Stränge getrennt. An die einzelnen DNA-Stränge können sich Oligonukleotide bestimmter Sequenz, die komplementär zum Beginn des jeweils zu amplifizierenden Abschnitts ist (Primer), nach Abkühlen auf das jeweilige Temperatur-optimum spezifisch anlagern. Dieser Vorgang wird Primer-Hybridisierung (engl. *primer annealing*) genannt und erfordert jeweils einen Vorwärts (engl. *forward*)- und einen Rückwärts (engl. *reverse*)-Primer, damit an beiden komplementären Strängen eine Vervielfältigung erfolgen kann. Im Anschluss erfolgt die Elongation ausgehend von dem Primer durch Anlagern der komplementären Nukleotide des DNA-Stranges mit Hilfe der Taq-Polymerase. Diese DNA-Polymerase ist hitzestabil, sodass sie während der Denaturierung nicht zerstört wird. Die Elongation erfolgt bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Die Dauer der Elongation ist abhängig von der Größe des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes, da die Taq-Polymerase etwa 1000 Nukleotide pro Minute anhängt. Die Zyklen werden etwa 25-35 Mal wiederholt.

2.2.5.5 Durchführung der PCR

Für die PCR wurden die cDNA-Proben eingesetzt, die komplementär zu der mRNA aus den HUVEC synthetisiert wurden. Jede cDNA-Probe stammt somit von diesen unterschiedlich stimulierten und behandelten HUVEC (siehe 2.2.5.1). Von jeder dieser cDNA-Proben wurde nun sowohl eine GAPDH-PCR als auch jeweils eine CD54 (ICAM-1)-, CD62E (E-Selektin)-, CD106 (VCAM-1)- und VEGF-PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze war jeweils dieselbe und unterschied sich nur in den zugefügten Primern und der eingesetzten zu amplifizierenden cDNA.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze:

Aqua dest.	19,9 µl
10 x Puffer S	2,5 µl
10 µM dNTP Mix	0,5 µl
10 µM Vorwärts-Primer (for)	0,5 µl
10 µM Rückwärts-Primer (rev)	0,5 µl
cDNA	1 µl
<u>Taq-Polymerase</u>	<u>0,1 µl</u>
Gesamtvolumen	25 µl

Als Negativ-Kontrolle wurde jeweils eine Probe ohne cDNA hergestellt. Die Taq-Polymerase und die zu amplifizierende cDNA wurden jeweils zuletzt hinzugegeben.

Die Reaktionsbedingungen der PCR unterschieden sich für die einzelnen Primer nur in der Hybridisierungstemperatur (engl. *annealing temperature*) und der Anzahl der Zyklen.

Verwendete Reaktionsbedingungen:

Initiale Denaturierung:

94°C 3 min

26-30 Zyklen:

94°C	30 sec	Denaturierung
55°C-58°C	30 sec	Primer-Hybridisierung
72°C	30 sec	Elongation

Finale Elongation:

72°C 5 min

Die verwendeten Primersequenzen mit den unterschiedlichen Versuchsbedingungen sind nachfolgend aufgeführt:

Tabelle 8: Primersequenzen und Versuchsbedingungen PCR

Gen	Primersequenz	Annealingtemperatur/ Zyklusanzahl/ Produktgröße
CD54	for 5` - TGACCAGCCCAAGTTGTTGG – 3` rev 5` - ATCTCTCCTCACCAGCACCG – 3`	55°C/26 Zyklen 379 bp
CD62E	for 5` - AAGCCTGGCAGTTCCGGG – 3` rev 5` - GGCTTTGGCAGCTGCTGG – 3`	56°C/26 Zyklen 308 bp
CD106	for 5` - CCAGAATCTAGATATCTTGCTC – 3` rev 5` - CAGCCTGTCAAATGGGTATAC – 3`	58°C/30 Zyklen 355 bp
GAPDH	for 5` - CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC – 3` rev 5` - TTCGTTGTCATACCAGGAAATG – 3`	58°C/26 Zyklen 451 bp
VEGF	for 5` - CGAAGTGGTGAAGTTCATGGA – 3` rev 5` - TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGT – 3`	55°C/30 Zyklen 469 bp

Die PCR-Produkte wurden nun entweder direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen oder bis zu eine Woche bei 4°C aufbewahrt und anschließend aufgetragen.

2.2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA- und RNA-Fragmente anhand ihrer Größe auftrennen. Aufgrund der negativen Ladung

der Nukleinsäuren wandern diese in einem elektrischen Feld zur positiven Anode. Werden sie nun dabei in ein Gel aus Agarosepolymeren eingebracht, welches je nach Konzentration der Agarose kleinere oder größere Poren enthält, wandern die kleineren Nukleinsäurefragmente schneller hindurch als die großen, sodass eine Auftrennung erfolgt. Mit Hilfe von Fragmenten definierter Größe als Marker lässt sich so die Größe eines DNA-Fragments bestimmen.

Für ein 1%iges Agarose-Gel wurde 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach einigen Minuten Abkühlen wurden 3 µl GelRed™ pro 100 ml Gel hinzugegeben und alles in die Agarose-Gelkammer gegossen. Diese war zuvor mit den passenden Kämmen zur Bildung von Taschen im Gel vorbereitet worden. Sobald das Gel fest geworden war, wurden die Kämmen entfernt und die DNA in die Taschen eingefüllt. Hierfür wurden je 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl DNA-Probenpuffer gemischt und davon jeweils 10 µl aufgetragen. Als Marker zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden 5 µl des GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder in eine Geltasche neben den anderen Proben pipettiert. Für 2 h wurde nun eine Spannung von 120 Volt angelegt.

Durch den Fluoreszenzfarbstoff GelRed™ im Agarose-Gel konnte die DNA, in die dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert, abschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.2.6 Immunfluoreszenz

2.2.6.1 Prinzip der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wird verwendet, um spezifische Antigene mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper nachzuweisen. Hierbei wird das Antigen entweder direkt mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert oder der erste Antikörper ist selbst nicht fluoreszierend und wird über einen sekundären fluoreszierenden Antikörper, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist, sichtbar. Mit dem Fluoreszenzmikroskop lässt sich so die Expression bestimmter Antigene nachweisen.

2.2.6.2 Durchführung der Immunfluoreszenz

Die in den gekammerten Objektträgern („Chamber Slides“) ausgesäten HUVEC ($0,3 \cdot 10^5$ Zellen/Kammer) wurden nach dem Wechsel des Kulturmediums auf Basalmedium mit Adalimumab, TNF α oder einer Kombination aus beidem inkubiert. Die Behandlung mit Adalimumab erfolgte mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ für insgesamt 5 h. TNF α wurde für 4 h, entsprechend 1 h nach der Adalimumabgabe, in einer Konzentration von 25 ng/ml zugegeben. Unbehandelte Zellen sowie Zellen, die mit dem IgG-Isotypantikörper (5 $\mu\text{g/ml}$, 1 h vor TNF α -Gabe) in Kombination mit TNF α behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Nach Ende der Inkubationszeit wurde jede Kammer zunächst zweimal mit 500 μl PBS gewaschen und anschließend mit 500 μl Methanol bei -20°C fixiert. Nach 5 min wurde das Methanol abgezogen und die fixierten Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden in jede Kammer 500 μl der Blockinglösung gegeben und alles 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Nach sorgfältigem Entfernen der Blockinglösung wurden in jede Kammer 300 μl Antikörpergrundlösung mit einem der 1. Antikörper nach untenstehendem Schema hinzugefügt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Da der Anti-CD106-Antikörper nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, wurde hierfür noch ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper benötigt, der gegen den murinen Antikörper gerichtet ist. Dieser wurde in die Kammer mit dem Anti-CD106-Antikörper gegeben, nachdem diese 3-mal mit PBS gewaschen wurde (jeweils 10 min auf dem Schüttler), und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Sobald die fluoreszenzmarkierten Antikörper zugegeben wurden, musste auf lichtgeschütztes Arbeiten geachtet werden, damit es nicht zu einer Abschwächung des Fluoreszenzsignals kam.

Nachfolgend findet sich die Auflistung der Ansätze für die Immunfluoreszenz:

1) unbehandelt	1. AK Anti-CD106	2. AK Anti-Maus
2) TNF α	1. AK Anti-CD106	2. AK Anti-Maus
3) Adalimumab	1. AK Anti-CD106	2. AK Anti-Maus
4) TNF α + Adalimumab	1. AK Anti-CD106	2. AK Anti-Maus
5) TNF α + IgG-Isotyp-AK	1. AK Anti-CD106	2. AK Anti-Maus
6) TNF α	ungefärbt	2. AK Anti-Maus
7) unbehandelt	1. AK Anti-CD54, FITC-konjugiert	
8) TNF α	1. AK Anti-CD54, FITC-konjugiert	
9) Adalimumab	1. AK Anti-CD54, FITC-konjugiert	
10) TNF α + Adalimumab	1. AK Anti-CD54, FITC-konjugiert	
11) TNF α + IgG-Isotyp-AK	1. AK Anti-CD54, FITC-konjugiert	
12) unbehandelt	1. AK Anti-CD62E, PE-konjugiert	
13) TNF α	1. AK Anti-CD62E, PE-konjugiert	
14) Adalimumab	1. AK Anti-CD62E, PE-konjugiert	
15) TNF α + Adalimumab	1. AK Anti-CD62E, PE-konjugiert	
16) TNF α + IgG-Isotyp-AK	1. AK Anti-CD62E, PE-konjugiert	

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde von allen Kammern die Antikörperlösung mit den nicht gebundenen Antikörpern vorsichtig entfernt und anschließend die Kammern mit PBS sorgfältig dreimal für 5 min und zweimal für 10 min gewaschen. Wenn die fixierten Zellen komplett getrocknet waren, wurden die Plastikkammern von den gekammerten Objektträgern entfernt und der verbleibende Objektträger mit den Zellen mit Einbett (engl. *mounting*)-Medium behandelt. In das Einbett-Medium wurde DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben, welches sich an die DNA anlagert und im ultravioletten Licht blau fluoresziert, sodass damit vor allem die Zellkerne darstellbar sind. Bevor die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop gemacht wurden,

wurde jeder Objektträger noch mit einem Deckglas abgedeckt. Als Mikroskop wurde das Axio Imager M1 sowie für die Aufnahmen die Axio Vision Software verwendet.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte größtenteils mittels Excel Software, womit der Mittelwert und der Standardfehler sowie der zweiseitige Student`s T-Test berechnet wurden. P-Werte von $<0,05$ (Konfidenzintervall 95%) wurden als statistisch signifikant angesehen. Ausnahmen sind an der jeweiligen Stelle vermerkt und beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Rollen und Adhäsion der Lymphozyten des peripheren Blutes an kultivierten Endothelzellen werden durch TNF α stimuliert

Um den Einfluss der TNF α -Stimulation auf die Interaktion von Endothelzellen und Lymphozyten zu untersuchen, wurden zunächst die Lymphozyten 10 freiwilliger Probanden betrachtet. In der Flusskammer strömten diese über einen Objektträger mit kultivierten Endothelzellen (HUVEC), welche entweder unstimuliert oder für 4 h mit 25 ng/ml TNF α stimuliert worden waren.

Alle in diesen Experimenten verwendeten Lymphozyten wurden aus dem venösen Vollblut der Probanden frisch isoliert. Je Proband wurden innerhalb eines Versuches jeweils 2 Objektträger für stimulierte und unbehandelte HUVEC gemessen. Zusätzlich wurden je Proband zwischen 2 und 4 unabhängige Versuche durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit nachzuweisen und mögliche Tagesschwankungen zu erfassen (spezifiziert in Abbildung 7). Ohne TNF α -Stimulation kam es bei sämtlichen Probanden zu keiner nennenswerten Interaktion zwischen den isolierten Lymphozyten und den HUVEC. Die Stimulation der Endothelzellen durch TNF α führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,001$ über alle Probanden) sowohl des Rollens als auch der festen Adhäsion (Abbildung 7 a und b). Die Anzahl der rollenden Zellen /10 min in einem Gesichtsfeld bei 160-facher Gesamtvergrößerung stieg im Mittel um das 82-fache von 0,50 (SEM \pm 0,12) auf 41,23 (SEM \pm 5,33) an, die Anzahl der adhärenen Zellen in einem Gesichtsfeld bei 160-facher Gesamtvergrößerung stieg im Mittel um das 14-fache von 0,65 (SEM \pm 0,13) auf 9,22 (SEM \pm 1,00) Zellen (Abbildung 7 a und b). Hierbei zeigten sich im Ausmaß dieses Anstiegs allerdings deutliche

Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden. Diese variierten zwischen 21 und 74 rollenden Zellen /10 min in einem Gesichtsfeld bei 160-facher Gesamtvergrößerung nach TNF α -Stimulation und zwischen 4,55 und 14,67 adhärennten Zellen in einem Gesichtsfeld bei 160-facher Gesamtvergrößerung nach TNF α -Stimulation (Abbildung 7 c und d). Da sich die erzielten Ergebnisse bei den einzelnen Patienten in Wiederholungsversuchen tendenziell bestätigten, also eine insgesamt befriedigende Reproduzierbarkeit vorlag, konnten inter-individuelle Unterschiede hinsichtlich des Rollens und der festen Adhäsion der Lymphozyten des peripheren Blutes an kultivierten Endothelzellen gezeigt werden.

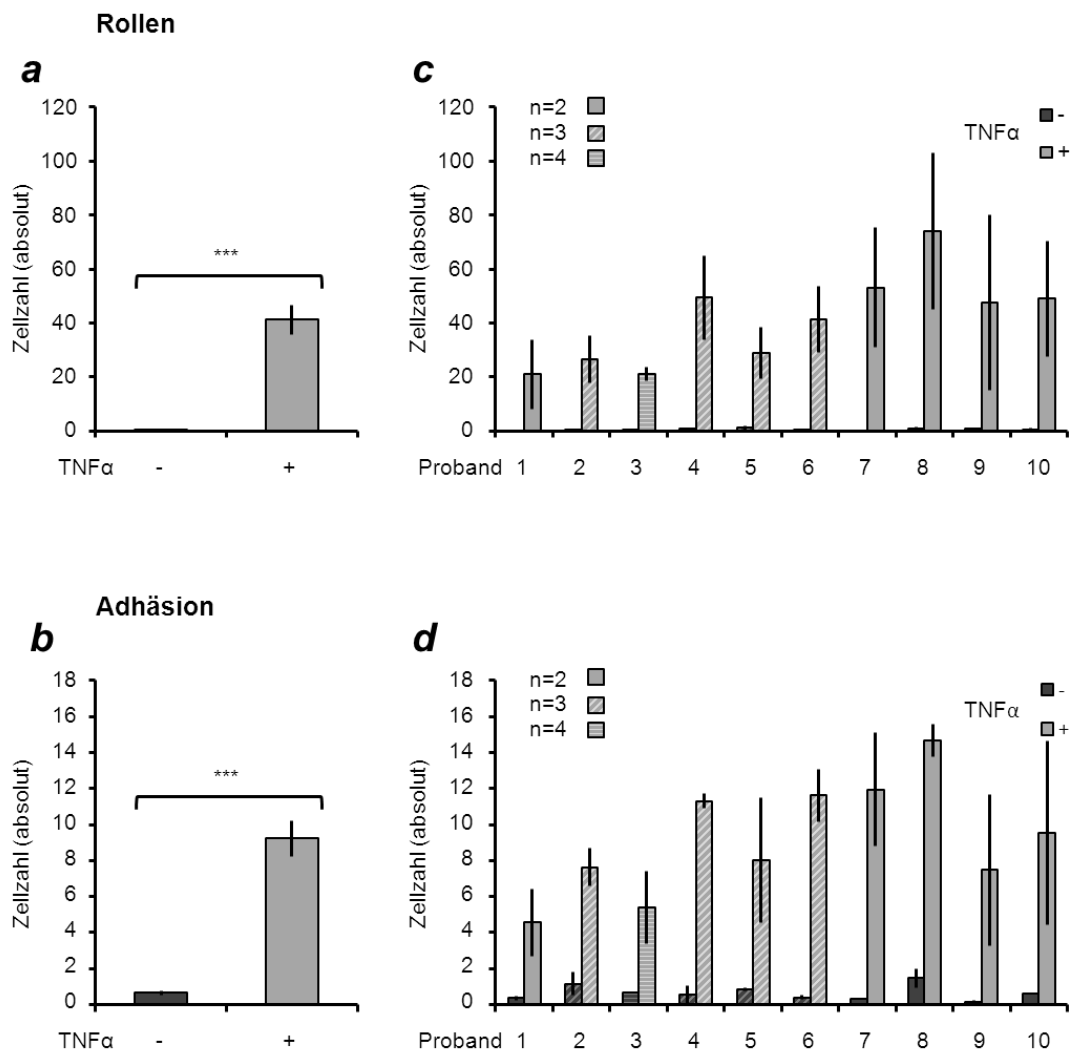


Abbildung 7: Inter-individuelle Unterschiede in der Interaktion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen nach TNF α -Stimulation.

Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler aller Probanden (ermittelt aus den Daten aus Abbildung c und d) jeweils für Rollen und Adhäsion (a und b). Zusätzlich dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler je Proband zwischen den Versuchswiederholungen (jeweils 2-4 Versuchsdurchführungen) für das Rollen und die Adhäsion (c und d). Zur Auszählung wurden jeweils der Mittelwert aus 2 x 1 Gesichtsfeld über 10 Minuten bei 160-facher Gesamtvergrößerung (a und c) sowie der Mittelwert aus 2 x 16 Gesichtsfeldern nach Ablauf der 10 Minuten bei 160-facher Gesamtvergrößerung (b und d) verwendet. *** $p < 0,001$. (modifiziert nach Lockmann und Schön 2014, die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.)

3.2 Einfrieren der PBMC ohne Einfluss auf Zusammensetzung und funktionelle Eigenschaften

Zur besseren Praktikabilität der experimentellen Abläufe wurden die PBMC vor Durchführung der eigentlichen Versuche nach der Isolierung aus Vollblut kryokonserviert. Um auszuschließen, dass es hierdurch zu einer Beeinträchtigung der PBMC kommt, haben wir sie bezüglich ihrer Zusammensetzung und ihrer funktionellen Eigenschaften in der Interaktion mit Endothelzellen untersucht. Eine intensive Literaturrecherche ergab, dass zwar einige deskriptive Arbeiten zu phänotypischen Charakteristika eingefrorener Lymphozyten im Vergleich zu frischen Lymphozyten publiziert wurden (Ashwood-Smith 1964, Cavers et al. 2002, Crowley et al. 1974, Faint et al. 2011, Ichino und Ishikawa 1985, Weinberg et al. 2007), dass jedoch zu funktionellen Daten bezüglich der Interaktion mit Endothelzellen keinerlei Veröffentlichungen vorlagen. Es mussten also zunächst Vorarbeiten durchgeführt werden, um die Stabilität funktioneller Eigenschaften kryokonservierter humaner Lymphozyten zu überprüfen:

Hierfür wurden Lymphozyten von 4 Probanden jeweils aus derselben Blutentnahme zum Teil eingefroren und zum Teil frisch untersucht und anschließend verglichen. In der Durchflusszytometrie wurde die Zusammensetzung der PBMC untersucht. Die Anteile an CD3-positiven Zellen (T-Zellen), CD14-positiven Zellen (Monozyten/Makrophagen) und CD19-positiven Zellen (B-Zellen) blieben hierbei weitestgehend unverändert, unabhängig davon, ob die PBMC frisch isoliert oder aufgetaut untersucht wurden (Abbildung 8). Dieses konnte sowohl im Mittel ($p > 0,7$ für alle untersuchten Populationen; Abbildung 8 a, b und c) als auch für jeden einzelnen Probanden (Abbildung 8 d, e und f) beobachtet werden.

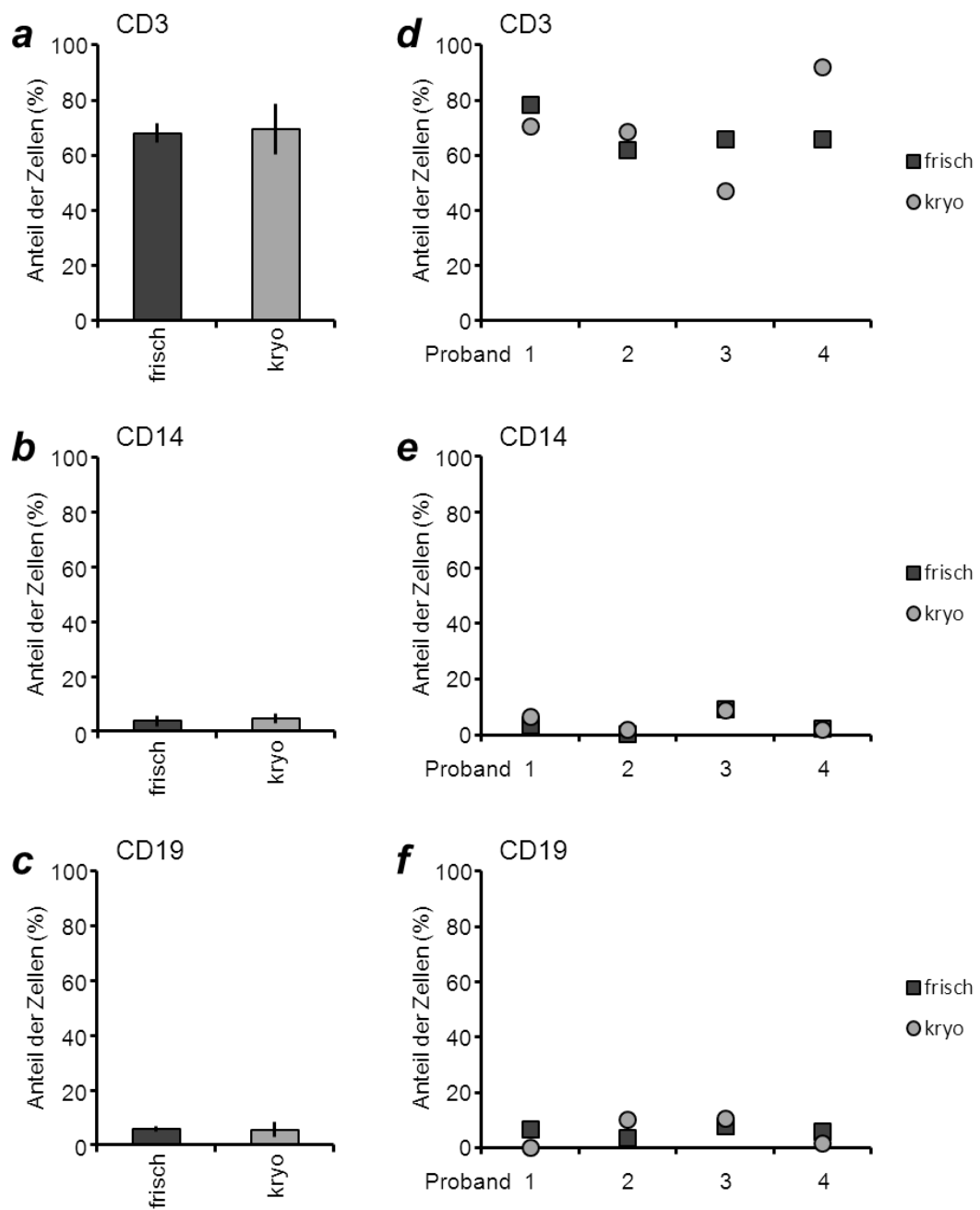


Abbildung 8: Unveränderte phänotypische Merkmale der PBMC nach Kryokonservierung.

In der Durchflusszytometrie blieb der Anteil der CD3-positiven Zellen (T-Zellen) an allen isolierten PBMC ($n=4$ Probanden) sowohl im Mittel (a) als auch für jeden einzelnen Probanden (d) unverändert. Auch der Anteil der CD14-positiven Zellen (Monozyten/Makrophagen) blieb im Mittel (b) und für jeden einzelnen Probanden (e) gleich. Dieses bestätigte sich auch im Mittel (c) und für jeden einzelnen Probanden (f) bezüglich der CD19-positiven Zellen (B-Zellen). (modifiziert nach Lockmann und Schön 2013, die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.)

Die Interaktion mit Endothelzellen wurde wieder in der Flusskammer untersucht. Hierbei wurde sowohl das Rollen als auch die feste Adhäsion der frischen und kryokonservierten PBMC von 5 Probanden jeweils mit unstimulierten und TNF α -stimulierten kultivierten Endothelzellen (HUVEC) verglichen. Dabei zeigte sich erneut die deutliche Stimulierbarkeit sowohl des Rollens (Abbildung 9 a) als auch der festen Adhäsion (Abbildung 9 b) durch Behandlung der Endothelzellen mit TNF α . Bezüglich des Rollens und der festen Adhäsion wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen frisch isolierten und kryokonservierten PBMC festgestellt, weder bei der Interaktion mit unstimulierten noch mit TNF α -stimulierten HUVEC (ANOVA F-Test, $p > 0,5$; Abbildung 9). Aus diesem Grund konnten die weiteren Flusskammerversuche unter Verwendung kryokonservierter PBMC durchgeführt werden.

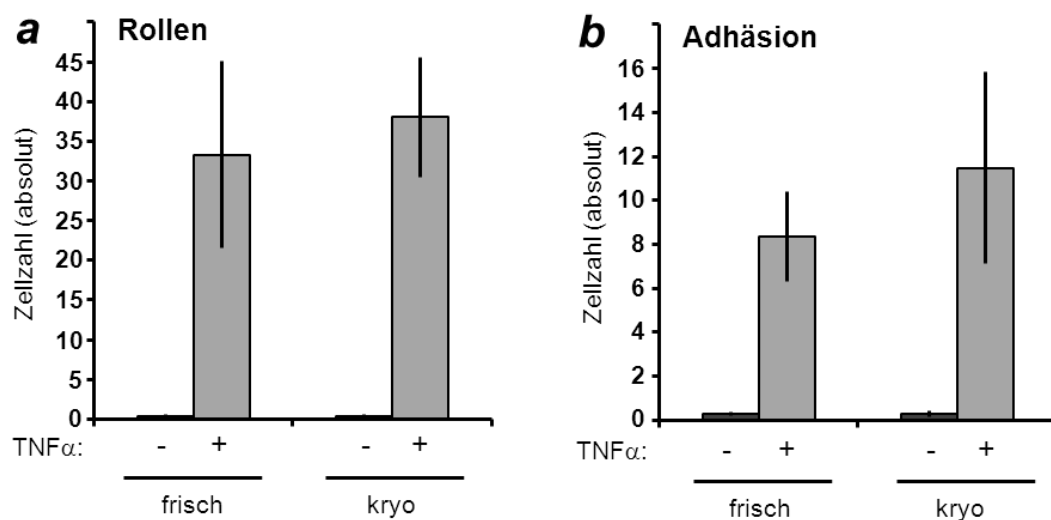


Abbildung 9: Keine signifikante Änderung der dynamischen Interaktionen von frisch isolierten und kryokonservierten PBMC mit Endothelzellen in der Flusskammer.

Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler ermittelt aus den Werten der rollenden (a) und fest adhären (b) frischen und kryokonservierten PBMC der einzelnen Probanden jeweils in Interaktion mit unstimulierten (schwarze Balken) und TNF α -stimulierten (graue Balken) HUVEC. Zur Auszählung jedes Probanden ($n=5$ Probanden) wurden jeweils der Mittelwert aus 2 x 1 Gesichtsfeld über 10 Minuten bei 160-facher Gesamtvergrößerung (a) sowie der Mittelwert aus 2 x 16 Gesichtsfeldern nach Ablauf der 10 Minuten bei 160-facher Gesamtvergrößerung (b) verwendet. (modifiziert nach Lockmann und Schön 2013, die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.)

3.3 Der Zeitpunkt der Adalimumab-Behandlung ist entscheidend für die Wirkung auf TNF α -stimulierte Endothelzellen

3.3.1 Adalimumab beeinflusst dynamische Interaktionen kultivierter Endothelzellen mit Lymphozyten

Da Kryokonservierung der PBMC keine funktionelle Beeinträchtigung in Flusskammerversuchen bewirkte (siehe 3.2), wurden die weiteren Versuche wegen der besseren Steuerbarkeit mit kryokonservierten PBMC durchgeführt. Um die Grundlage für die Untersuchungen der PBMC von Psoriasis-Patienten zu schaffen, wurde zunächst der Einfluss von Adalimumab auf TNF α -stimulierte Endothelzellen hinsichtlich der Interaktion mit PBMC untersucht. Dazu wurden umfangreiche Flusskammerexperimente, in denen kultivierte Endothelzellen mit Adalimumab in verschiedenen Konzentrationen und für unterschiedliche Zeiten behandelt wurden, durchgeführt.

Auffällig war, dass der Zeitpunkt der Adalimumab-Behandlung einen deutlichen Einfluss auf die Interaktion der TNF α -stimulierten Endothelzellen mit den PBMC hatte. Wurde Adalimumab in einer Konzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ vor oder gleichzeitig mit TNF α gegeben, hob es die TNF α -induzierte Wirkung auf und sowohl das Rollen als auch die feste Adhäsion gingen nahezu auf den Ausgangswert zurück. Höhere Konzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ oder 50 $\mu\text{g/ml}$ konnten folglich keinen weiteren Rückgang des Rollens und der festen Adhäsion bewirken; bei Verwendung von Adalimumab in der geringeren Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich diese Tendenz ebenfalls, erreichte jedoch zumeist nicht vollständig das Ausgangsniveau (Abbildung 10, obere 6 Felder). Im Gegensatz dazu hatte Adalimumab nach bereits erfolgter TNF α -Stimulation keinen inhibierenden Einfluss auf die dynamischen Interaktionen stimulierter Endothelzellen mit Leukozyten. Dieses blieb selbst bei Konzentrationen des Adalimumab von bis zu 50 $\mu\text{g/ml}$ unverändert (Abbildung 10, untere 4 Felder).

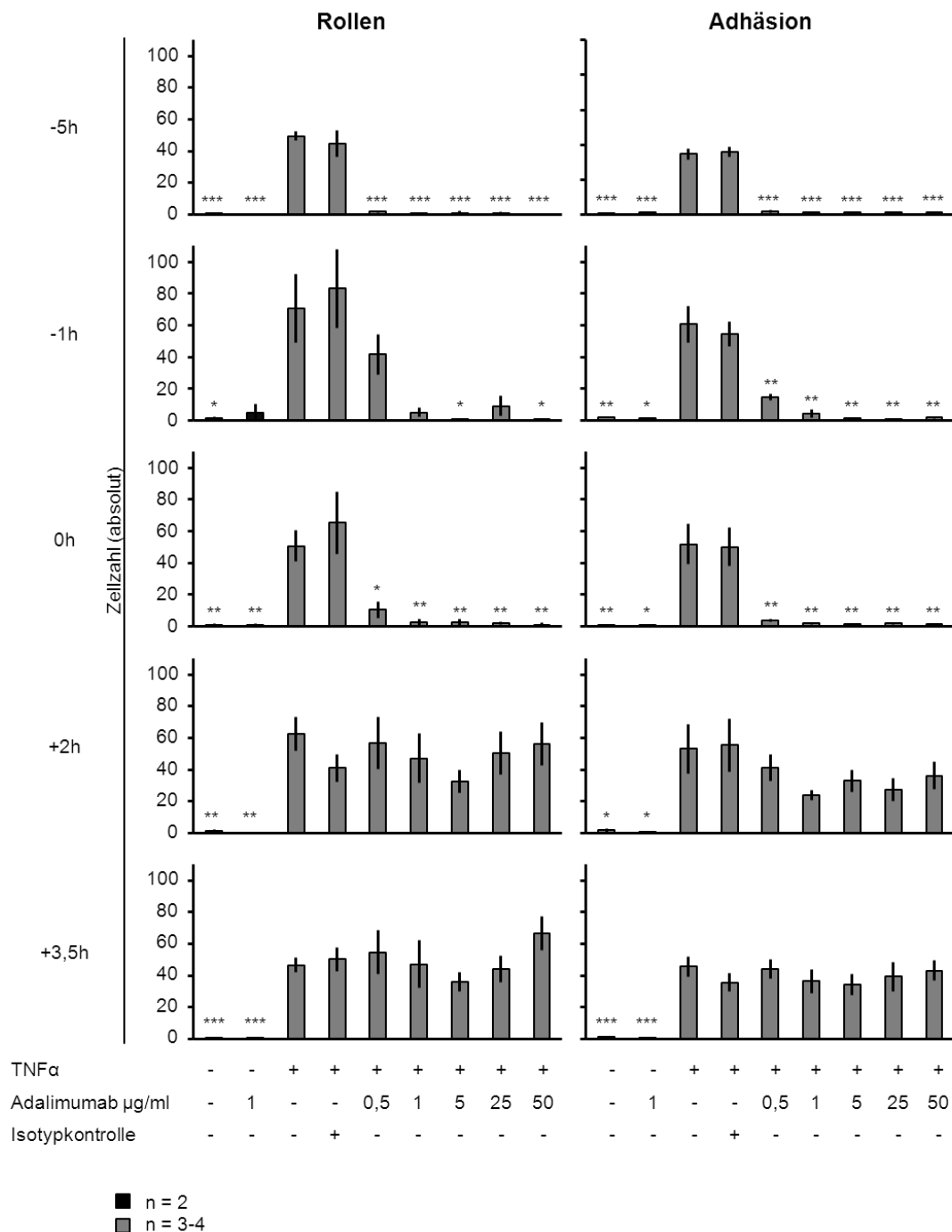


Abbildung 10: Zeit- und Konzentrationsreihen der Adalimumab-Inkubation TNF α -stimulierter Endothelzellen in Interaktion mit PBMC im Flusskammerversuch.

Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler für jede Bedingung, jeweils ermittelt aus 2 bis 4 Einzel-Experimenten mit PBMC unterschiedlicher Probanden. Die Endothelzellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor (-5h und -1h), gleichzeitig mit (0h) oder nach (+2h und +3,5h) TNF α -Stimulation mit Adalimumab in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Unstimulierte Zellen mit oder ohne Adalimumab sowie Isotypkontroll-behandelte Zellen dienten als Kontrollen. Zur Auszählung der einzelnen Versuche wurden jeweils die rollenden Zellen in 1 Gesichtsfeld für 10 Minuten bei

160-facher Gesamtvergrößerung (linke Felder) gezählt sowie der Mittelwert der adhärenierten Zellen aus 16 Gesichtsfeldern nach Ablauf der 10 Minuten bei 80-facher Gesamtvergrößerung (rechte Felder) bestimmt. * kennzeichnet $p < 0,05$; ** kennzeichnet $p < 0,01$ und *** kennzeichnet $p < 0,001$ im T-Test bezogen auf den Unterschied des jeweiligen Wertes zu dem Wert der alleinigen TNF α -Stimulation. (modifiziert nach Lockmann und Schön 2014, die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.)

3.3.2 Der Zeitpunkt der Adalimumab-Behandlung bestimmt die TNF α -induzierte Transkription endothelialer Adhäsionsmoleküle

Der Einfluss von Adalimumab auf die endotheliale Antigen-Expression *in vitro* war, passend zu den dynamischen Untersuchungen im Flusskammermodell, abhängig vom Zeitpunkt der Behandlung. Auf Transkriptionsebene wurde dies mit der Polymerase-Kettenreaktion untersucht. Hierbei wurden drei wichtige Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin) durch TNF α stark induziert. Übereinstimmend mit den Flusskammerexperimenten war die Aufhebung dieser durch TNF α -stimulierten Expression durch Adalimumab abhängig von dem Zeitpunkt der Behandlung: Vor oder gleichzeitig mit TNF α gegeben, führte Adalimumab zur Aufhebung der Induktion durch TNF α (Abbildung 11, obere drei Felder). Im Gegensatz dazu hatte die dem TNF α nachfolgende Behandlung mit Adalimumab keinen Einfluss (Abbildung 11, untere zwei Felder). Adalimumab-Konzentrationen von 0,5 bis 50 $\mu\text{g/ml}$ hatten jeweils den gleichen Effekt (Abbildung 11). Die Transkription von VEGF war weder induzierbar durch Stimulation der Endothelzellen mit TNF α noch zeigte sich ein Einfluss durch die Behandlung mit Adalimumab (Abbildung 11). Durch diese Kontrolle wurde gezeigt, dass die Wirkungen von TNF α und Adalimumab auf die drei Adhäsionsmoleküle nicht auf einer generellen Beeinflussung der zellulären Transkription beruhten. Für alle Versuche wurde außerdem die GAPDH-Expression als Kontrolle verwendet, um unterschiedliche Mengen an aufgetragener cDNA als Ursache der beobachteten Veränderungen auszuschließen.

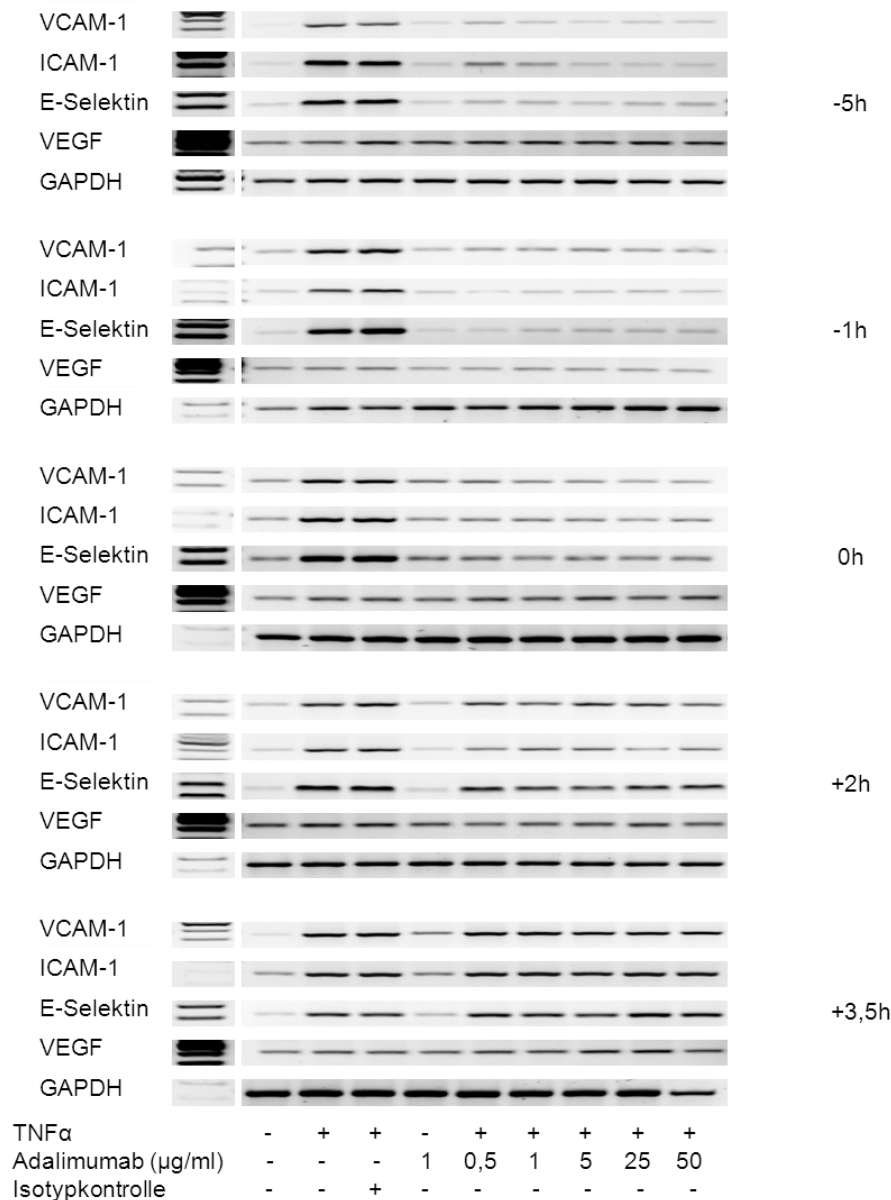


Abbildung 11: TNF α und Adalimumab beeinflussen die Expression von VCAM-1 (CD106), ICAM-1 (CD54) und E-Selektin (CD62E) auf kultivierten Endothelzellen.

HUVEC wurden mit TNF α und/oder Adalimumab in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Transkripte der drei Adhäsionsmoleküle sowie der zur Kontrolle mit untersuchten Genprodukte VEGF und GAPDH wurden durch RT-PCR nachgewiesen. Die Behandlung der kultivierten Endothelzellen mit TNF α führte zum deutlichen Anstieg der Expression der mRNA von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin. Wurde Adalimumab vor oder gleichzeitig mit TNF α zugesetzt (-5h, -1h, 0h), ergab sich bei jeder Konzentration eine Reduktion dieses Effekts nahezu auf den Ausgangswert der unstimulierten Zellen (obere 3 Felder). Eine Behandlung mit Adalimumab nach der TNF α -Stimulation zeigte hingegen keinen Einfluss (untere 2 Felder). Die VEGF-Transkription blieb nach TNF α -Stimulation sowie Adalimumab-Behandlung unverändert. Als Kontrolle dienten unstimulierte unbehandelte oder Adalimumab-behandelte Endothelzellen sowie stimulierte mit einem passenden Adalimumab-Isotypkontrollantikörper behandelte Endothelzellen. Als Ladekontrolle wurde die GAPDH-Expression untersucht. Die gezeigten

Experimente sind repräsentativ für insgesamt jeweils zwei Experimente mit ähnlichen Ergebnissen. (modifiziert nach Lockmann und Schön 2014, die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.)

3.3.3 Adalimumab reduziert die Zelloberflächen-Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin auf kultivierten Endothelzellen

Die Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin auf der Oberfläche von Endothelzellen wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Auch auf Protein-Ebene wurde die Expression aller drei Adhäsionsmoleküle durch TNF α induziert. Die Behandlung mit Adalimumab in einer Konzentration von 5 μ g/ml vor der TNF α -Stimulation (-1h) führte zur Aufhebung dieses Stimulationseffektes (Abbildung 12). Diese Experimente belegten, dass Adalimumab die funktionell wichtige Zelloberflächen-Expression der drei zentralen Adhäsionsmoleküle in einem von TNF α beeinflussten experimentellen Modell unterdrücken kann.

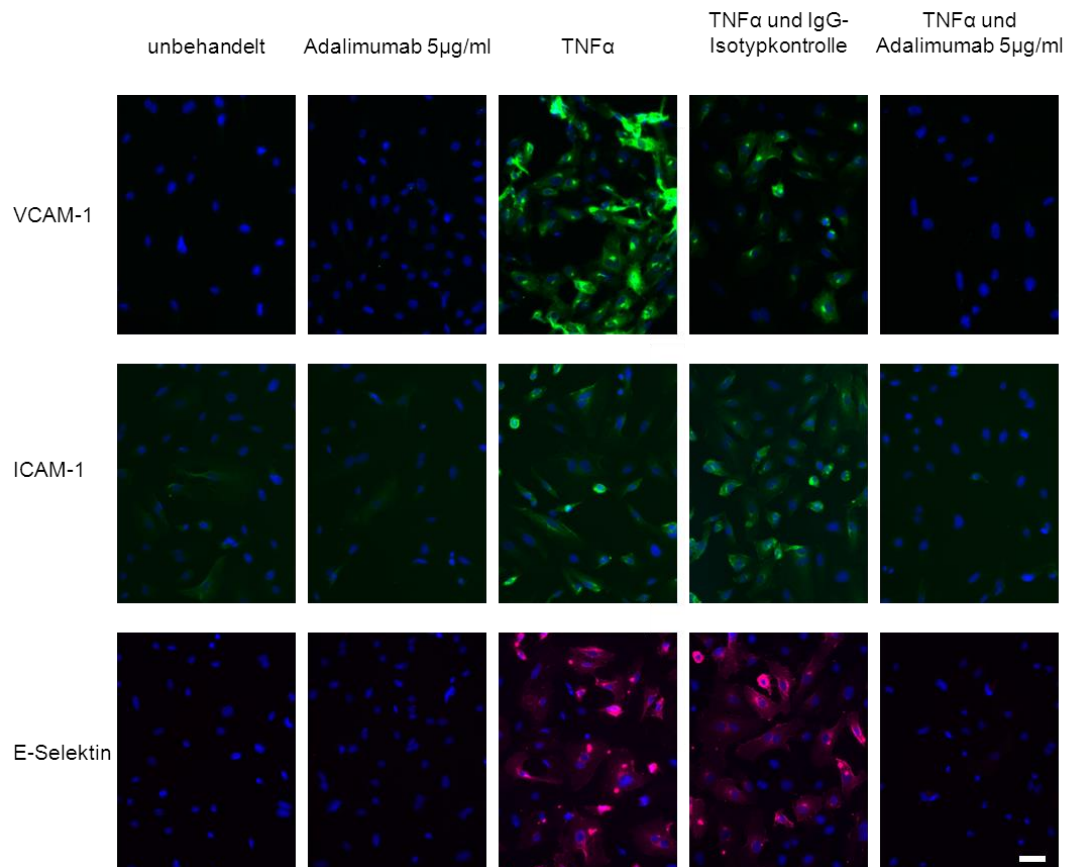


Abbildung 12: Die Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin auf TNF α -stimulierten Endothelzellen wird durch Adalimumab unterdrückt.

Die durch TNF α -Stimulation hervorgerufene erhöhte Oberflächenexpression der drei Adhäsionsmoleküle wurde durch die Behandlung der Endothelzellen mit 5 μ g/ml Adalimumab eine Stunde vor der Stimulation aufgehoben. Als Kontrolle dienten unstimulierte unbehandelte oder Adalimumab-behandelte Endothelzellen sowie TNF α -stimulierte und mit einem IgG-Isotypkontrollantikörper für Adalimumab behandelte Endothelzellen. Längensbalken = 50 μ m. Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für insgesamt jeweils zwei Experimente mit ähnlichen Ergebnissen. (modifiziert nach Lockmann und Schön 2014, die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.)

3.4 Die Interaktion von Lymphozyten mit TNF α -stimulierten Endothelzellen *in vitro* ist unabhängig von klinischer Wirksamkeit von Adalimumab

Nachdem die Lymphozyten gesunder Probanden im Flusskammerversuch inter-individuelle Unterschiede beim Rollen und der Adhäsion auf TNF α -stimulierten Endothelzellen zeigten (siehe 3.1), wurden diese Funktionen auch mit Lymphozyten von Psoriasis-Patienten untersucht. Hierbei zeigten

sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten in der Stimulierbarkeit durch TNF α , sowohl bei Patienten mit gutem Ansprechen auf die Therapie mit Adalimumab („Responder“) als auch bei Patienten ohne Benefit unter Therapie mit Adalimumab („Non-Responder“) (Abbildung 13). Diese Stimulierbarkeit durch TNF α variierte in einem Bereich von 29,75 (SEM \pm 4,25) bis 83,75 (SEM \pm 11,75) rollenden Zellen /10 Minuten in einem Gesichtsfeld bei 160-facher Gesamtvergrößerung sowie zwischen 30,56 (SEM \pm 4,81) und 64,59 (SEM \pm 7,75) adhärennten Zellen pro Gesichtsfeld bei 80-facher Gesamtvergrößerung. Da diese interindividuellen Unterschiede in der Stimulierbarkeit durch TNF α möglicherweise einen Teil des unterschiedlichen Ansprechens auf eine Therapie mit Adalimumab erklären könnten, wurden die Lymphozyten von „Respondern“ (n=5) und „Non-Respondern“ (n=5) diesbezüglich genauer untersucht. Ziel war es, einen prädiktiven Test für das Ansprechen bestimmter Patienten auf die Adalimumab-Therapie, der im klinischen Alltag praktikabel ist, zu finden. Hierzu wurden kultivierte Endothelzellen (HUVEC) als Interaktionspartner der PBMC nicht nur mit TNF α behandelt, sondern zusätzlich zu verschiedenen Zeitpunkten mit Adalimumab in einer Konzentration von 5 μ g/ml. Dies ist eine Konzentration, welche bei Patienten dem Talspiegel unter Therapie mit Adalimumab entspricht (Traczewski und Rudnicka 2008) und sich in den vorherigen Versuchen als repräsentative Konzentration in dem untersuchten Bereich erwiesen hat. Bezüglich des Rollens und der Adhäsion der Lymphozyten von „Respondern“ und „Non-Respondern“ ließ sich die Aufhebung des Effektes von TNF α bei Behandlung vor oder gleichzeitig zur TNF α -Stimulation wiederholen (Abbildung 14, siehe auch 3.3). Ebenso wie in den Untersuchungen der PBMC gesunder Probanden hatte die Adalimumab-Behandlung der Endothelzellen nachfolgend der TNF α -Stimulation keinen Effekt (Abbildung 14). Hierbei ergaben sich zwischen den beiden Gruppen (Responder und Non-Responder) keine Unterschiede, weder bei unstimulierten Endothelzellen noch bei der TNF α -Stimulation oder der

Behandlung mit Adalimumab zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($p > 0,07$ für alle Bedingungen, Abbildung 14).

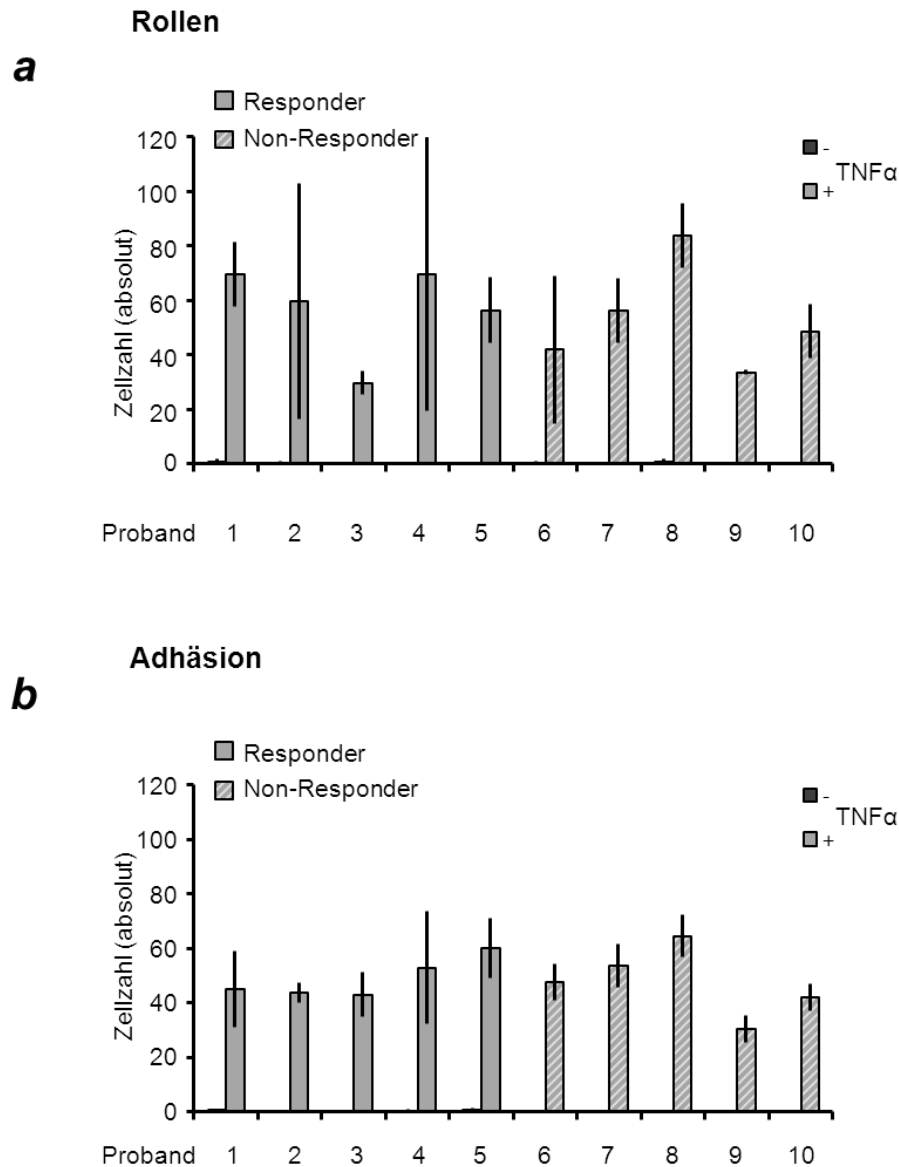


Abbildung 13: Rollen und feste Adhäsion der PBMC von 10 Psoriasis-Patienten auf TNF α -stimulierten Endothelzellen zeigen im Flusskammerversuch inter-individuelle Unterschiede.

Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler je Patient aus jeweils 2 Versuchen. Zur Auszählung der einzelnen Versuche wurde für das Rollen (a) jeweils der Wert der rollenden Zellen über 10 Minuten bei 160-facher Gesamtvergrößerung ermittelt sowie für die Adhäsion (b) der Mittelwert der adhärenierten Zellen aus 16 Gesichtsfeldern nach Ablauf von 10 Minuten bei 80-facher Gesamtvergrößerung. (modifiziert nach Lockmann und Schön 2014, die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.)

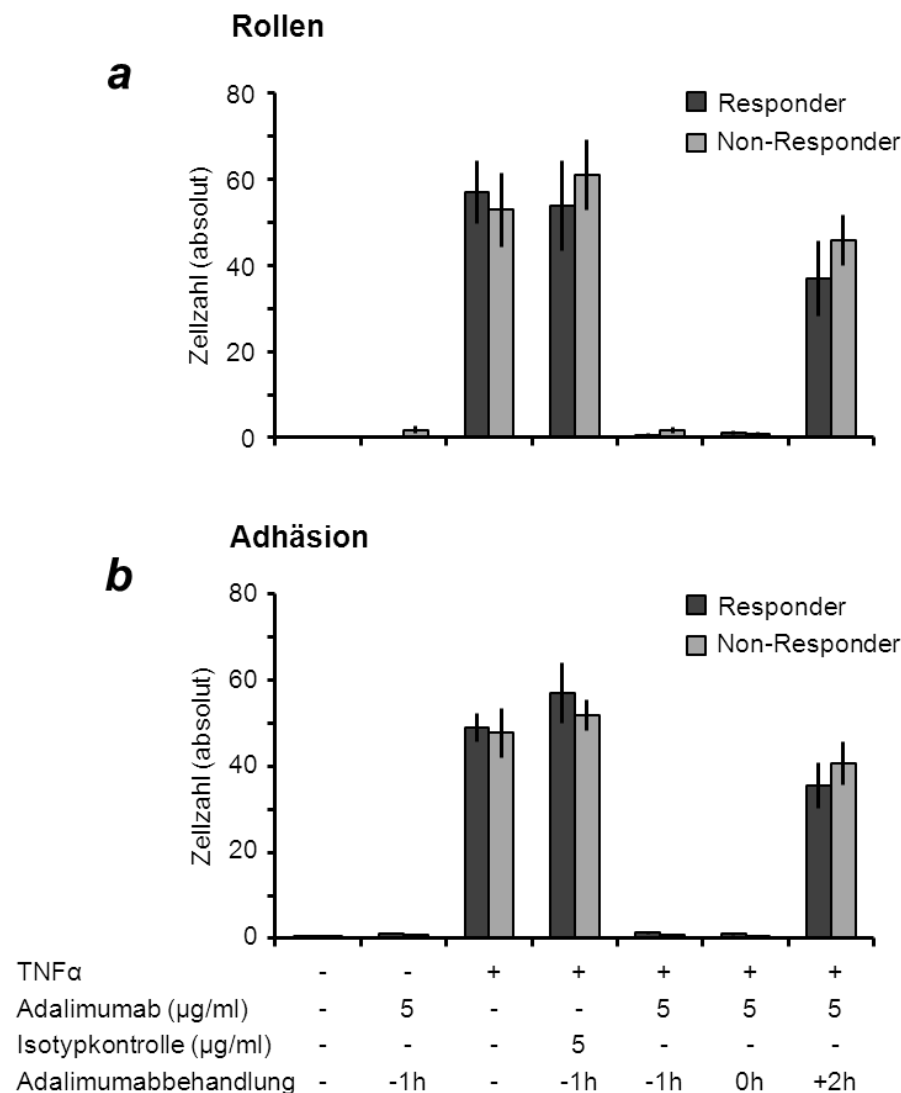


Abbildung 14: Die *in vitro* Interaktion zwischen PBMC von Psoriasis-Patienten und kultivierten Endothelzellen ist unabhängig vom klinischen Ansprechen auf Adalimumab.

Im Vergleich der PBMC von Psoriasis-Patienten mit gutem Ansprechen auf Adalimumab („Responder“, dunkelgraue Balken) zu Patienten mit schlechtem Ansprechen („Non-Responder“, hellgraue Balken) zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Interaktion mit kultivierten Endothelzellen im Flusskammerversuch. Bei beiden Gruppen führte die Adalimumab-Behandlung vor oder gleichzeitig zur TNF α -Stimulation (-1h und 0h) zur Aufhebung der Stimulation. Im Gegensatz dazu fehlte dieser Effekt bei nachfolgender Adalimumab-Behandlung (+2h). Unstimulierte Zellen mit und ohne Adalimumab-Inkubation sowie mit einem Antikörper gleichen Isotyps behandelte Zellen dienten als Kontrollen. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und der Standardfehler, die jeweils aus den Patienten-Gruppen (5 Responder, 5 Non-Responder) ermittelt wurden. Zur Auszählung der einzelnen Versuche wurde für das Rollen (a) jeweils der Wert der rollenden Zellen über 10 Minuten bei 160-facher Gesamtvergrößerung bestimmt sowie für die Adhäsion (b) der Mittelwert der adhären Zellen aus 16 Gesichtsfeldern nach Ablauf von 10 Minuten bei 80-facher Gesamtvergrößerung berechnet. Für jeden Patienten wurden 2 Versuche durchgeführt. (modifiziert nach Lockmann und Schön 2014, die Verwendung erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.)

4 Diskussion

Seit die ersten monoklonalen Antikörper in den letzten Jahrzehnten therapeutisch eingesetzt wurden, haben sich auch in der Pathogenese der Psoriasis viele neue Erkenntnisse ergeben (Johnson-Huang et al. 2012). Insbesondere die Schlüsselrolle von TNF α im immunologischen Geschehen der Psoriasis wurde durch die Wirksamkeit von TNF α -Blockern deutlich (Griffiths und Barker 2007). Dennoch bestehen weiterhin einige Unklarheiten über Anti-TNF α -Antikörper wie Adalimumab. Insbesondere ist bisher nicht bekannt, warum einige Patienten nicht oder kaum von der Therapie profitieren, während die meisten eine deutliche Besserung der Erkrankung aufweisen (Gordon et al. 2006). Daraus resultiert die unnötige Behandlung von so genannten „Non-Respondern“, welche dem Risiko unangenehmer und gefährlicher Nebenwirkungen ausgesetzt werden, ohne einen Nutzen durch die Therapie zu erfahren (Burmester et al. 2013).

Das Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede zwischen verschiedenen Personen hinsichtlich der Interaktion zwischen Lymphozyten *ex vivo* und kultivierten Endothelzellen zu untersuchen, um mögliche Unterschiede zwischen „Respondern“ und „Non-Respondern“ als Grundlage für einen prädiktiven Test für das Ansprechen auf die Therapie ausfindig zu machen.

4.1 Inter-individuelle Unterschiede der Interaktion von Lymphozyten *ex vivo* mit kultivierten Endothelzellen als Prädiktor für klinisches Ansprechen auf Adalimumab?

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass frisch isolierte oder kryokonservierte Leukozyten sowohl von gesunden Probanden als auch von Psoriasis-Patienten in Flusskammerversuchen reproduzierbar bezüglich ihrer Interaktion mit TNF α -aktivierten Endothelzellen untersucht werden können. Hierbei zeigten sich deutliche inter-individuelle Unterschiede im

Ausmaß des Rollens und der festen Adhäsion der Lymphozyten auf TNF α -stimulierten Endothelzellen. Da diese Unterschiede gleichermaßen bei gesunden Probanden und bei Psoriasis-Patienten bestanden, war anzunehmen, dass hier eine mögliche Ursache für das unterschiedliche klinische Ansprechen auf eine Therapie mit Adalimumab als TNF α -Blocker liegen könnte.

In weiteren Experimenten wurde jedoch deutlich, dass diese Unterschiede nicht mit dem Ansprechen auf die Therapie mit Adalimumab *in vivo* assoziiert waren, da bezüglich der adhäsiven Leukozyten-Endothel-Interaktionen keine signifikanten Unterschiede zwischen „Respondern“ und „Non-Respondern“ nachweisbar waren. Dieses könnte jedoch darin begründet sein, dass die Interaktion der Lymphozyten aus den Patienten mit kultivierten Endothelzellen untersucht wurde. Die Möglichkeit der individuell unterschiedlichen Beeinflussbarkeit endothelialer Funktionen konnte somit nicht untersucht werden. Durch die in dieser Arbeit gewählte Methode wäre im klinischen Alltag zwar die praktikable Durchführung mit geringer Belastung für den Patienten zu erreichen, in den Endothelzellen der Patienten begründete Unterschiede bleiben allerdings unberücksichtigt.

Vorteile bei der Verwendung von HUVEC (humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen) sind, dass diese nicht immortalisiert sind, durch Aktivierung Adhäsionsmoleküle exprimieren und weit gehende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten (Bouis et al. 2001, Jaffe et al. 1973). Um jedoch individuelle Unterschiede der Endothelzellen jedes einzelnen Patienten zu berücksichtigen, wäre es erforderlich, Endothelzellen der Patienten selbst mit den jeweiligen (autologen) Lymphozyten interagieren zu lassen. Diesbezüglich müssten Endothelzellen aus der Haut von Patienten isoliert und kultiviert werden, wofür ausreichend Haut des Patienten entnommen werden müsste (Davison et al. 1983), was für den Patienten belastend und im klinischen Alltag kaum durchführbar ist. Zusätzlich ist die Isolierung mit Kontaminationen durch andere Zelltypen, insbesondere Fibroblasten, verbunden, sodass durch die verschiedenen Aufreinigungen ein deutlicher

Zellverlust sowie Arbeitsaufwand entstünden (Davison et al. 1983, Imcke et al. 1991).

Abgesehen von den Auswirkungen der Anti-TNF α -Therapie auf die Endothelzellen der Patienten gibt es Beobachtungen an Immunzellen, die auf weitere, nicht durch die direkte Neutralisation von TNF α verursachte, Wirkmechanismen hinweisen. So zeigen zum Beispiel verschiedene TNF α -Blocker unterschiedliche Effekte und Nebenwirkungen (Fantuzzi et al. 2008, Horiuchi et al. 2010). Neben Ursachen, die sich auf unterschiedliche Affinität, Gewebegängigkeit und Halbwertszeit dieser Medikamente zurückführen lassen (Shim 2011), könnten Auswirkungen auf membrangebundenes TNF α hierbei eine Rolle spielen (Horiuchi et al. 2010). Verschiedene Anti-TNF α -Therapeutika haben hierbei unterschiedliche Effekte auf TNF α -tragende Zellen, beispielsweise durch Apoptoseinduktion sowie durch Komplementaktivierung und nachfolgender Lyse durch natürliche Killerzellen, möglicherweise bedingt durch ihre unterschiedliche Struktur und Bindungsdomänen (Horiuchi et al. 2010, Schottelius et al. 2004). Diese Mechanismen hatten in der hier genutzten *in vitro*-Situation, in der der Einfluss von löslichem TNF α auf Endothelzellen und ihre Interaktion mit Lymphozyten (PBMC) untersucht wurde, keinen Einfluss, könnten aber *in vivo* für das unterschiedliche Ansprechen auf die Therapie mit Adalimumab verantwortlich sein.

Zudem wurden weitere, möglicherweise TNF α -unabhängige oder indirekt durch noch nicht genau bekannte Zytokin-Regulationen hervorgerufene, Effekte von Adalimumab beobachtet, die für unterschiedliches Ansprechen auf die Therapie verantwortlich sein könnten (Fantuzzi et al. 2008): Zum Beispiel wurde die CD69-Expression auf Neutrophilen unter Therapie mit Adalimumab vermindert, sodass hier entweder ein TNF α -unabhängiger Effekt oder ein bisher noch nicht bekannter Regulationsweg durch TNF α vorliegen müsste (Capsoni et al. 2005). In den Untersuchungen in dieser Arbeit ließen sich jedoch auf der Ebene der Endothelzellen und ihrer

Interaktion mit isolierten Lymphozyten (PBMC) keine unerwarteten oder TNF α -unabhängigen Wirkungen beobachten.

Auch eine Neutralisation von Adalimumab durch Antikörperbildung als Ursache eines Nicht-Ansprechens auf die Therapie ist zu bedenken. Obwohl Adalimumab als vollständig humaner Antikörper weniger immunogen ist als chimäre Anti-TNF α -Antikörper, wurde die Bildung neutralisierender Antikörper gegen Adalimumab beschrieben (Shim 2011, Sidiropoulos und Boumpas 2006). Die dadurch bedingten Einflüsse auf die Wirksamkeit der Therapie werden allerdings kontrovers diskutiert. So war in einer Studie keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein neutralisierender Antikörper und verringertem Ansprechen auf die Adalimumab-Therapie zu beobachten (van de Putte et al. 2004). Im Gegensatz dazu zeigte sich in anderen Studien ein Zusammenhang zwischen neutralisierenden Antikörpern und vermindertem Ansprechen auf die Therapie (Bartelds et al. 2007, Bartelds et al. 2011). Nichtsdestoweniger zeigen nicht alle Patienten mit neutralisierenden Antikörpern ein reduziertes Ansprechen auf die Therapie und nicht alle „Non-Responder“ haben neutralisierende Antikörper: In einer prospektiven Studie mit 272 Patienten mit rheumatoider Arthritis unter Adalimumab-Therapie entwickelten 28% Antikörper gegen Adalimumab, wobei nur bei 41% von diesen ein Therapieabbruch aufgrund von Therapieversagen erfolgte (Bartelds et al. 2011). Zudem hatten von den Patienten, welche die Therapie aufgrund fehlender Wirksamkeit abgebrochen hatten, weniger als die Hälfte (46%) nachweisbare Antikörper gegen Adalimumab (Bartelds et al. 2011). Daher begründet die Bildung neutralisierender Antikörper gegen Adalimumab bestenfalls einen Teil der fehlenden Wirksamkeit der Therapie und weitere Faktoren müssen zusätzlich Einfluss nehmen.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden die Leukozyten der Patienten und nicht deren Serum untersucht, sodass mögliche Antikörper nicht mit dem Adalimumab innerhalb der Versuche interferieren

konnten. Allerdings könnte die Antikörperbildung dennoch ursächlich für die fehlende klinische Wirksamkeit bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten sein, indem das TNF α möglicherweise nicht mehr durch das neutralisierte Adalimumab abgefangen werden konnte und somit *in vivo* weiter vorhanden war. Da diese Antikörper in unseren *ex vivo*-Experimenten keinen Einfluss mehr nehmen würden, könnten sich hierdurch die fehlenden Unterschiede zwischen „Respondern“ und „Non-Respondern“ erklären lassen.

Weitere Ursachen, die ein Nicht-Ansprechen auf die Therapie mit TNF α -Blockern bedingen könnten, sind genetische Faktoren (Johnson-Huang et al. 2012). Auch wenn in einigen Studien Expressionsmuster bestimmter Gene, zum Beispiel Differenzierungsgene für den Th17-Weg (Zaba et al. 2009) oder CD11c (Stuhlmüller et al. 2009), mit einem Nicht-Ansprechen korreliert waren, stimmten die Studienergebnisse untereinander nicht überein (Toonen et al. 2012). Dieses kann durch die geringe Anzahl der Studienteilnehmer, durch unterschiedliche Methodik, verschiedene Untersuchungsmaterialien, Untersuchungen im Rahmen unterschiedlicher Grunderkrankungen und verschiedener TNF α -inhibierender Medikamente bedingt sein (Badot et al. 2009, Stuhlmüller et al. 2009, Toonen et al. 2012, Zaba et al. 2009). Daher ist es bisher nicht gelungen, reproduzierbare Expressionsmuster zu identifizieren, die ein Ansprechen auf eine Anti-TNF α -Therapie vorhersagen könnten. Auch bezüglich der Interaktion zwischen Endothelzellen und Lymphozyten *ex vivo* konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede zwischen „Respondern“ und „Non-Respondern“ gesehen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit also trotz inter-individueller Unterschiede in der Interaktion von Lymphozyten *ex vivo* mit kultivierten Endothelzellen keine Assoziation mit dem klinischen Ansprechen auf die Adalimumab-Therapie beobachtet werden. Vielfältige weitere Ursachen, die

in dem verwendeten System nicht untersucht wurden, könnten für die unterschiedliche Wirksamkeit des Medikaments in Frage kommen, unter anderem die Bildung neutralisierender Antikörper, unterschiedliche Genexpressionsmuster oder Unterschiede in der Reaktion der Endothelzellen auf Adalimumab. Da hier bisher widersprüchliche Ergebnisse vorliegen und die Bedeutung einzelner Unterschiede unklar ist, sind in Zukunft noch weitere Untersuchungen zur Aufklärung erforderlich.

4.2 Klinische Bedeutung der Abhängigkeit der Adalimumabwirkung vom Zeitpunkt der Behandlung *in vitro*

Wie bereits bekannt und erwartet kam es in den *in vitro*-Experimenten nach TNF α -Stimulation zu einer vermehrten Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin auf kultivierten humanen Endothelzellen (HUVEC) (Klein et al. 1995, Mako et al. 2010, Nickoloff et al. 2007, Oostingh et al. 2007, Terajima et al. 1998, Wallbrecht et al. 2011). Ebenso kam es zu einem Anstieg des Rollens und der festen Adhäsion der Lymphozyten auf den stimulierten Endothelzellen. Letztere Beobachtung passt zum gegenwärtigen Wissensstand, nach dem diese frühen Schritte der Rekrutierung der Leukozyten durch Adhäsionsmoleküle vermittelt werden (Barker und Nickoloff 1992, Schön et al. 2003, Shimizu et al. 1991, Springer 1994). Wie durch die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen gezeigt werden konnte, erfolgt diese Regulation auf der Ebene der Transkription. Hierbei konnte zusätzlich sowohl bezüglich der Expression der Adhäsionsmoleküle als auch in der Interaktion der Endothelzellen mit Lymphozyten eine Reduktion des TNF α -induzierten Effekts durch Adalimumab erreicht werden. Übereinstimmend dazu konnte in früheren Forschungen zumeist eine verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle durch TNF α -Blocker nachgewiesen werden, obwohl einige Kontroversen bezüglich einzelner Adhäsionsmoleküle bestanden:

So konnten verringerte Serum-Spiegel von ICAM-1 und E-Selektin, jedoch nicht von VCAM-1, nach Behandlung mit einem monoklonalen TNF α -Blocker bei Patienten mit rheumatoider Arthritis erreicht werden (Paleolog et al. 1996). Im Gegensatz dazu wurde eine Reduktion von VCAM-1 und E-Selektin in Biopsien aus der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis nach Behandlung mit einem TNF α -Blocker beobachtet (Tak et al. 1996). In einer Studie mit Adalimumab hingegen konnte bei rheumatoider Arthritis eine Reduktion der Serum-Spiegel von ICAM-1 erreicht werden, jedoch nicht von E-Selektin (den Broeder et al. 2002). Allerdings wurde ebenfalls für Adalimumab, übereinstimmend mit unseren Beobachtungen, auch eine Reduktion der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin beschrieben (Traczewski und Rudnicka 2008). Diese teils widersprüchlichen Aussagen sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien (Serum, Synovia) oder Unterschiede bei den verwendeten Antikörpern zurückzuführen. Zusätzlich sind diese Untersuchungen nach Behandlung mit TNF α -Blockern zumeist *in vivo* durchgeführt worden, wohingegen in dieser Arbeit eine *ex vivo*-Behandlung erfolgte. Besonders *in vivo* können daher weitere Faktoren die Expression der Adhäsionsmoleküle beeinflussen, da diese bekanntermaßen in dem komplexen Zytokinnetzwerk nicht nur durch TNF α , sondern zusätzlich durch weitere Zytokine parakrin oder autokrin reguliert werden, unter anderem durch IL-1 (Nickoloff et al. 2007). Zumindest für Infliximab als TNF α -Blocker konnte aber auch *in vivo* gezeigt werden, dass es insgesamt durch die Therapie zu einer Reduktion der T-Zellen ohne Nachweis von Apoptose kam, sodass von einer verminderten Einwanderung der T-Zellen auszugehen ist (Goedkoop et al. 2004), passend zu den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen *in vitro*.

VEGF, welcher als angiogener Faktor in der Haut eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Psoriasis spielt (Nestle et al. 2009, Traczewski und Rudnicka 2008), wurde in früheren Untersuchungen *in vivo* durch Adalimumab herunterreguliert (Campanati et al. 2012, Markham et al.

2006). Dennoch zeigte sich in dieser Arbeit weder ein Einfluss von TNF α noch von Adalimumab auf die Transkription von VEGF. Diese widersprüchlichen Beobachtungen könnten dadurch verursacht sein, dass in dieser Arbeit die Expression von VEGF in Endothelzellen beobachtet wurde, im Gegensatz zur Untersuchung der Expression in mesenchymalen Stammzellen (Campanati et al. 2012) oder in der gesamten Haut (Markham et al. 2006). Obwohl die VEGF-Produktion in Keratinozyten, Fibroblasten und vielen weiteren Zelltypen, darunter auch Endothelzellen, beschrieben wurde (Detmar et al. 1997, Helotera und Alitalo 2007), ist diese Expression in Endothelzellen möglicherweise nicht (allein) durch TNF α reguliert. In anderen Zelltypen hingegen, zum Beispiel in Keratinozyten, ist eine vermehrte Expression von VEGF durch TNF α bekannt (Khanna et al. 2001). Daher könnten sich die Unterschiede zwischen den *in vivo* beschriebenen Effekten von Adalimumab auf VEGF (Campanati et al. 2012, Markham et al. 2006) und den Beobachtungen bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Experimenten durch die Vermittlung über nicht-endotheliale Zellen erklären lassen.

In weiteren Experimenten zeigte sich ein deutlicher Einfluss des Zeitpunktes der Behandlung der TNF α -stimulierten Endothelzellen mit Adalimumab: Sowohl in Bezug auf die Expression der Adhäsionsmoleküle als auch in der Interaktion mit Lymphozyten von gesunden Probanden oder Psoriasis-Patienten zeigte Adalimumab eine deutliche Wirkung im Sinne einer Aufhebung des TNF α -Effektes, sofern es vor oder gleichzeitig damit hinzugefügt wurde. Die durch TNF α -Stimulation bereits eingeleiteten Veränderungen ließen sich somit durch nachträgliche Gabe von Adalimumab nicht mehr beeinflussen. Dieses lässt sich durch die Wirkung des Adalimumab als TNF α -Antikörper erklären, welcher TNF α bindet, damit dieses nicht über die physiologischen TNF α -Rezeptoren wirken kann (Schottelius et al. 2004). Ist durch TNF α erst einmal die vermehrte Transkription und Translation der Adhäsionsmoleküle angestoßen worden,

ließ sich dieses durch Adalimumab nicht mehr rückgängig machen, passend auch zu der klinischen Erfahrung, dass die Wirkung der Therapie nicht sofort, sondern unter Auftreten einer langsamen Besserung eintritt, wenn die TNF α -induzierten Effekte nachlassen (Gordon et al. 2006, Scheinfeld 2004). Allerdings ist, zumindest teilweise, die Dauer bis zum Eintritt der Wirkung sicherlich auch durch die subkutane Verabreichung zu erklären, da dadurch die maximalen Serumkonzentrationen erst fünf Tage nach der Gabe erreicht werden (Traczewski und Rudnicka 2008). Insbesondere wenn man den Wirkmechanismus von TNF α bedenkt, der hauptsächlich über Regulation der Genexpression erfolgt, sind die diesbezüglich in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen durchaus plausibel (Aggarwal 2003).

Eine weitere Ursache dafür, dass die durch TNF α induzierten Effekte stabil vorhanden blieben, auch wenn Adalimumab im Anschluss hinzugefügt wurde und keine weitere kontinuierliche Stimulation durch TNF α mehr erfolgte, könnte in weiteren bisher nicht vollständig geklärten TNF α -assoziierten Wirkmechanismen liegen. In diesem Zusammenhang wurden bereits weitere Wirkmechanismen der Anti-TNF α -Therapie diskutiert, die zusätzlich zur direkten Neutralisation von TNF α auftreten. So bindet Adalimumab unter anderem auch an membrangebundenes und rezeptorgebundenes TNF α und kann somit auch die TNF α -tragenden Zellen in ihren Eigenschaften und Verhaltensweisen modifizieren (siehe auch 4.1) (Fantuzzi et al. 2008, Lowes et al. 2007, Schottelius et al. 2004). In unseren Versuchen zeigten sich jedoch keine unerwarteten Effekte durch TNF α oder Adalimumab, zumindest nicht in den untersuchten Auswirkungen auf die Endothelzellen und deren Interaktion mit Lymphozyten.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten haben sich die so genannten Biologika auch zur Therapie der Psoriasis etabliert. Zu diesen Medikamenten gehört auch Adalimumab, welches als vollständig humaner Antikörper eines der Schlüsselzytokine in der Pathogenese der Psoriasis, TNF α , neutralisiert. Allerdings führt die Therapie nicht bei allen Patienten zu ausreichendem Wirkerfolg. Da bisher vor Beginn der Therapie nicht zwischen den Patienten, die von der Therapie profitieren, und denen, die keine ausreichende Wirkung erfahren, unterschieden werden kann, werden die letzteren unnötigerweise den Risiken und Nebenwirkungen dieser Therapie ausgesetzt. In dieser Arbeit wurden die Interaktionen kultivierter Endothelzellen und Lymphozyten *ex vivo* unter dem Einfluss von Adalimumab untersucht. Insbesondere auf mögliche Unterschiede zwischen „Respondern“ und „Non-Respondern“ wurde im Hinblick auf die mögliche Entwicklung eines prädiktiven Tests für das Ansprechen auf Adalimumab ein Schwerpunkt gelegt.

Lymphozyten gesunder Probanden und von Psoriasis-Patienten wurden *ex vivo* hinsichtlich ihrer Interaktion mit kultivierten Endothelzellen (HUVEC), mit und ohne TNF α -Stimulation, untersucht. Hierbei wurden sowohl frisch isolierte als auch kryokonservierte Lymphozyten verwendet, da sich zwischen diesen keine Unterschiede in den funktionellen Flusskammer-Versuchen zeigten. Nach Stimulation der Endothelzellen mit TNF α kam es zu einem deutlichen Anstieg des Rollens und der festen Adhäsion aller Lymphozyten an den Endothelzellen. Allerdings zeigten sich im Ausmaß dieser Interaktion deutliche inter-individuelle Unterschiede. Obwohl diese auch bei Psoriasis-Patienten auftraten, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen „Respondern“ und „Non-Respondern“ beobachtet werden.

In den Untersuchungen zum Einfluss von Adalimumab auf TNF α -stimulierte Endothelzellen sowie die Interaktion dieser mit Lymphozyten *ex vivo* zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Auswirkung vom Zeitpunkt der Behandlung. Erfolgte die Adalimumab-Behandlung vor oder gleichzeitig mit der TNF α -Stimulation der Endothelzellen, kam es zur Aufhebung der TNF α -induzierten Effekte sowohl in der Transkription der Adhäsionsmoleküle (PCR), der Expression dieser (Immunfluoreszenz-Mikroskopie) sowie der dynamischen Interaktionen mit Lymphozyten (Flusskammer). Eine dem TNF α nachfolgende Behandlung blieb ohne Wirkung, sodass davon auszugehen ist, dass sich die bereits induzierten Prozesse nicht mehr rückgängig machen lassen. Hier könnte eine Erklärung für das späte Eintreten der Adalimumab-Wirkung *in vivo* liegen.

Somit konnten in dieser Arbeit vier zentrale Ergebnisse erzielt werden:

Erstens, es wurde erstmals gezeigt, dass wichtige funktionelle Eigenschaften humaner Lymphozyten während der Kryokonservierung erhalten bleiben.

Zweitens, es wurden erstmals deutliche inter-individuelle Unterschiede im Ausmaß der Interaktion zwischen Lymphozyten *ex vivo* mit TNF α -stimulierten Endothelzellen nachgewiesen. Adalimumab unterdrückte diese dynamischen Interaktionen, sofern seine Zugabe vor oder gleichzeitig mit der TNF α -Exposition erfolgte.

Drittens, diese inter-individuellen Unterschiede bestanden gleichermaßen bei gesunden Probanden und Psoriasis-Patienten.

Viertens, die funktionellen Unterschiede erlaubten keine Unterscheidung zwischen Psoriasis-Patienten, deren Erkrankung sich durch Adalimumab besserte („Responder“), und denen, deren Erkrankung nicht auf diese Therapie ansprach („Non-Responder“).

6 Literaturverzeichnis

Aggarwal BB (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756

Altobelli E, Petrocelli R, Marziliano C, Fargnoli MC, Maccarone M, Chimenti S, Peris K (2007): Family history of psoriasis and age at disease onset in Italian patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 156, 1400-1401

Ashwood-Smith MJ (1964): Low Temperature Preservation of Mouse Lymphocytes with Dimethyl Sulfoxide. *Blood* 23, 494-501

Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG (1999): The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 113, 752-759

Badot V, Galant C, Nzeusseu Toukap A, Theate I, Maudoux AL, Van den Eynde BJ, Durez P, Houssiau FA, Lauwerys BR (2009): Gene expression profiling in the synovium identifies a predictive signature of absence of response to adalimumab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11, R57

Barker JN, Nickoloff BJ (1992): Leukocyte-endothelium interactions in cutaneous inflammatory processes. *Springer Semin Immunopathol* 13, 355-367

Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BA, Tak PP, Wolbink GJ (2007): Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66, 921-926

Bartelds GM, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JW, Dijkmans BA, Aarden L, Wolbink GJ (2011): Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* 305, 1460-1468

Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F (2005): IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 174, 3695-3702

Bouis D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH (2001): Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4, 91-102

Bowcock AM, Krueger JG (2005): Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 5, 699-711

Boyce EG, Halilovic J, Stan-Ugbene O (2010): Golimumab: Review of the efficacy and tolerability of a recently approved tumor necrosis factor-alpha inhibitor. *Clin Ther* 32, 1681-1703

Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO (2004): Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med* 199, 731-736

Burmester GR, Panaccione R, Gordon KB, McIlraith MJ, Lacerda AP (2013): Adalimumab: long-term safety in 23 458 patients from global clinical trials in rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Ann Rheum Dis* 72, 517-524

Campanati A, Orciani M, Gorbi S, Regoli F, Di Primio R, Offidani A (2012): Effect of biologic therapies targeting tumour necrosis factor-alpha on cutaneous mesenchymal stem cells in psoriasis. *Br J Dermatol* 167, 68-76

Caproni M, Antiga E, Melani L, Volpi W, Del Bianco E, Fabbri P (2009): Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial. *J Clin Immunol* 29, 210-214

Capsoni F, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Minonzio F, Bonara P, Doria A, Carrabba M (2005): Effect of adalimumab on neutrophil function in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, R250-255

Cavers M, Afzali B, Macey M, McCarthy DA, Irshad S, Brown KA (2002): Differential expression of beta1 and beta2 integrins and L-selectin on CD4+ and CD8+ T lymphocytes in human blood: comparative analysis between isolated cells, whole blood samples and cryopreserved preparations. *Clin Exp Immunol* 127, 60-65

Christophers E (2001): Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 26, 314-320

Crow JM (2012): Psoriasis uncovered. *Nature* 492, S50-51

Crowley JP, Rene A, Valeri CR (1974): The recovery, structure, and function of human blood leukocytes after freeze-preservation. *Cryobiology* 11, 395-409

Davison PM, Bensch K, Karasek MA (1983): Isolation and long-term serial cultivation of endothelial cells from the microvessels of the adult human dermis. *In Vitro* 19, 937-945

den Broeder AA, Joosten LA, Saxne T, Heinegard D, Fenner H, Miltenburg AM, Frasa WL, van Tits LJ, Buurman WA, van Riel PL et al. (2002): Long term anti-tumour necrosis factor alpha monotherapy in rheumatoid arthritis: effect on radiological course and prognostic value of markers of cartilage turnover and endothelial activation. *Ann Rheum Dis* 61, 311-318

Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, Claffey KP (1997): Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol* 108, 263-268

Eedy DJ, Burrows D, Bridges JM, Jones FG (1990): Clearance of severe psoriasis after allogenic bone marrow transplantation. *BMJ* 300, 908

Ettehadi P, Greaves MW, Wallach D, Aderka D, Camp RD (1994): Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol* 96, 146-151

Faint JM, Tuncer C, Garg A, Adams DH, Lalor PF (2011): Functional consequences of human lymphocyte cryopreservation: implications for subsequent interactions of cells with endothelium. *J Immunother* 34, 588-596

Fantuzzi F, Del Giglio M, Gisondi P, Girolomoni G (2008): Targeting tumor necrosis factor alpha in psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert Opin Ther Targets* 12, 1085-1096

Garcia-Perez ME, Stevanovic T, Poubelle PE (2013): New therapies under development for psoriasis treatment. *Curr Opin Pediatr* 25, 480-487

Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, Boasson M, Saint Andre JP, Verret JL (1990): Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 126, 1523

Goedkoop AY, Kraan MC, Teunissen MB, Picavet DI, de Rie MA, Bos JD, Tak PP (2004): Early effects of tumour necrosis factor alpha blockade on skin and synovial tissue in patients with active psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 63, 769-773

Gordon KB, Langley RG, Leonardi C, Toth D, Menter MA, Kang S, Heffernan M, Miller B, Hamlin R, Lim L et al. (2006): Clinical response to adalimumab treatment in patients with moderate to severe psoriasis: double-blind, randomized controlled trial and open-label extension study. *J Am Acad Dermatol* 55, 598-606

Griffiths CE, Barker JN (2007): Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370, 263-271

Groves RW, Allen MH, Barker JN, Haskard DO, MacDonald DM (1991): Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in cutaneous inflammation. *Br J Dermatol* 124, 117-123

Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A, Runarsdottir EH, Hauksson VB, Upmanyu R, Gulcher J, Stefansson K, Valdimarsson H (2003): Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol* 148, 233-235

Guhl G, Diaz-Ley B, Fernandez-Herrera J (2008): [Off-label use of biologic agents in the treatment of dermatosis, part 2: etanercept, efalizumab, alefacept, rituximab, daclizumab, basiliximab, omalizumab, and cetuximab]. *Actas Dermosifiliogr* 99, 5-33

Halprin KM (1972): Epidermal "turnover time"--a re-examination. *Br J Dermatol* 86, 14-19

Hebra F, Elfinger A: Atlas der Hautkrankheiten (Lfg.3 Seborrhoea, Ichthyosis, Psoriasis, Lichen); *Kaiserliche Akademie der Wissenschaften*, Wien 1859

Helotera H, Alitalo K (2007): The VEGF family, the inside story. *Cell* 130, 591-592

Henseler T, Christophers E (1985): Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 13, 450-456

Honigsmann H (2001): Phototherapy for psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 26, 343-350

- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T (2010): Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49, 1215-1228
- Ichino Y, Ishikawa T (1985): Effects of cryopreservation on human lymphocyte functions: comparison of programmed freezing method by a direct control system with a mechanical freezing method. *J Immunol Methods* 77, 283-290
- Imcke E, Ruszczak Z, Mayer-da Silva A, Detmar M, Orfanos CE (1991): Cultivation of human dermal microvascular endothelial cells in vitro: immunocytochemical and ultrastructural characterization and effect of treatment with three synthetic retinoids. *Arch Dermatol Res* 283, 149-157
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52, 2745-2756
- Johnson-Huang LM, Lowes MA, Krueger JG (2012): Putting together the psoriasis puzzle: an update on developing targeted therapies. *Dis Model Mech* 5, 423-433
- Khanna S, Roy S, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK (2001): Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radic Biol Med* 31, 38-42
- Klein CL, Bittinger F, Kohler H, Wagner M, Otto M, Hermanns I, Kirkpatrick CJ (1995): Comparative studies on vascular endothelium in vitro. 3. Effects of cytokines on the expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 by cultured human endothelial cells obtained from different passages. *Pathobiology* 63, 83-92
- Krueger JG (2002): The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* 46, 1-23; quiz 23-26
- Langley RG, Krueger GG, Griffiths CE (2005): Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 2, ii18-23
- Lockmann A, Schön MP (2013): Phenotypic and functional traits of peripheral blood mononuclear cells retained by controlled cryopreservation: implications for reliable sequential studies of dynamic interactions with endothelial cells. *Exp Dermatol* 22, 358-359
- Lockmann A, Schön MP (2014): TNF α -induced leukocyte-endothelial cell interactions show marked inter-individual differences independent of the clinical response to adalimumab. *Exp Dermatol* 24, 133-135

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001): The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501

Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG (2007): Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445, 866-873

Mak RK, Hundhausen C, Nestle FO (2009): Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. *Actas Dermosifiliogr* 100 Suppl 2, 2-13

Mako V, Czucz J, Weiszhar Z, Herczenik E, Matko J, Prohaszka Z, Cervenak L (2010): Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. *Cytometry A* 77, 962-970

Marble DJ, Gordon KB, Nickoloff BJ (2007): Targeting TNFalpha rapidly reduces density of dendritic cells and macrophages in psoriatic plaques with restoration of epidermal keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci* 48, 87-101

Markham T, Mullan R, Golden-Mason L, Rogers S, Bresnihan B, Fitzgerald O, Fearon U, Veale DJ (2006): Resolution of endothelial activation and down-regulation of Tie2 receptor in psoriatic skin after infliximab therapy. *J Am Acad Dermatol* 54, 1003-1012

McInnes IB, Kavanaugh A, Gottlieb AB, Puig L, Rahman P, Ritchlin C, Brodmerkel C, Li S, Wang Y, Mendelsohn AM et al. (2013): Efficacy and safety of ustekinumab in patients with active psoriatic arthritis: 1 year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled PSUMMIT 1 trial. *Lancet* 382, 780-789

Menter A, Tying SK, Gordon K, Kimball AB, Leonardi CL, Langley RG, Strober BE, Kaul M, Gu Y, Okun M et al. (2008): Adalimumab therapy for moderate to severe psoriasis: A randomized, controlled phase III trial. *J Am Acad Dermatol* 58, 106-115

Mosmann TR, Coffman RL (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173

Mosmann TR, Sad S (1996): The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17, 138-146

Nast A, Boehncke WH, Mrowietz U, Ockenfels HM, Philipp S, Reich K, Rosenbach T, Sammain A, Schlaeger M, Sebastian M et al. (2012): German S3-guidelines on the treatment of psoriasis vulgaris (short version). *Arch Dermatol Res* 304, 87-113

Nestle FO, Kaplan DH, Barker J (2009): Psoriasis. *N Engl J Med* 361, 496-509

Nickoloff BJ, Xin H, Nestle FO, Qin JZ (2007): The cytokine and chemokine network in psoriasis. *Clin Dermatol* 25, 568-573

Nogralas KE, Davidovici B, Krueger JG (2010): New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg* 29, 3-9

Oostingh GJ, Schlickum S, Friedl P, Schön MP (2007): Impaired induction of adhesion molecule expression in immortalized endothelial cells leads to functional defects in dynamic interactions with lymphocytes. *J Invest Dermatol* 127, 2253-2258

Paleolog EM, Hunt M, Elliott MJ, Feldmann M, Maini RN, Woody JN (1996): Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39, 1082-1091

Parish CR (1999): Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 77, 499-508

Pathirana D, Ormerod AD, Saiag P, Smith C, Spuls PI, Nast A, Barker J, Bos JD, Burmester GR, Chimenti S et al. (2009): European S3-guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23 Suppl 2, 1-70

Roberson ED, Bowcock AM (2010): Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet* 26, 415-423

Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, Kasman I, Winer J, Modrusan Z, Danilenko DM et al. (2007): The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol* 178, 2229-2240

Saurat JH, Stingl G, Dubertret L, Papp K, Langley RG, Ortonne JP, Unnebrink K, Kaul M, Camez A (2008): Efficacy and safety results from the randomized controlled comparative study of adalimumab vs. methotrexate vs. placebo in patients with psoriasis (CHAMPION). *Br J Dermatol* 158, 558-566

Scheinfeld N (2004): Adalimumab (Humira): a brief review for dermatologists. *J Dermatolog Treat* 15, 348-352

Scheinfeld N (2005): Adalimumab: a review of side effects. *Expert Opin Drug Saf* 4, 637-641

Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B (1994): T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 102, 145-149

Schön MP (2005): Inhibitors of selectin functions in the treatment of inflammatory skin disorders. *Ther Clin Risk Manag* 1, 201-208

Schön MP, Boehncke WH (2005): Psoriasis. *N Engl J Med* 352, 1899-1912

Schön MP, Zollner TM, Boehncke WH (2003): The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J Invest Dermatol* 121, 951-962

Schön MP, Boehncke WH, Bröcker EB (2005): Psoriasis: Clinical manifestations, pathogenesis and therapeutic perspectives. *Discov Med* 5, 253-258

Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK, 3rd (2004): Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp Dermatol* 13, 193-222

Shim H (2011): One target, different effects: a comparison of distinct therapeutic antibodies against the same targets. *Exp Mol Med* 43, 539-549

Shimizu Y, Newman W, Gopal TV, Horgan KJ, Graber N, Beall LD, van Seventer GA, Shaw S (1991): Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol* 113, 1203-1212

Sidiropoulos PI, Boumpas DT (2006): Differential drug resistance to anti-tumour necrosis factor agents in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65, 701-703

Sjögren F, Davidsson K, Sjöstrom M, Anderson CD (2012): Cutaneous microdialysis: cytokine evidence for altered innate reactivity in the skin of psoriasis patients? *AAPS J* 14, 187-195

Springer TA (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314

Strober BE, Armour K, Romiti R, Smith C, Tebbey PW, Menter A, Leonardi C (2011): Biopharmaceuticals and biosimilars in psoriasis: what the dermatologist needs to know. *J Am Acad Dermatol* 66, 317-322

Stuhlmüller B, Haupl T, Hernandez MM, Grutzkau A, Kuban RJ, Tandon N, Voss JW, Salfeld J, Kinne RW, Burmester GR (2009): CD11c as a transcriptional biomarker to predict response to anti-TNF monotherapy with adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther* 87, 311-321

Suarez-Farinas M, Li K, Fuentes-Duculan J, Hayden K, Brodmerkel C, Krueger JG (2012): Expanding the psoriasis disease profile: interrogation of the skin and serum of patients with moderate-to-severe psoriasis. *J Invest Dermatol* 132, 2552-2564

Tak PP, Taylor PC, Breedveld FC, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meinders AE, Maini RN (1996): Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39, 1077-1081

Talamonti M, Spallone G, Di Stefani A, Costanzo A, Chimenti S (2011): Efalizumab. *Expert Opin Drug Saf* 10, 239-251

Terajima S, Higaki M, Igarashi Y, Nogita T, Kawashima M (1998): An important role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of adhesion molecules in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 290, 246-252

Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M (1980): Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol* 102, 179-184

Toonen EJ, Gilissen C, Franke B, Kievit W, Eijsbouts AM, den Broeder AA, van Reijmersdal SV, Veltman JA, Scheffer H, Radstake TR et al. (2012): Validation study of existing gene expression signatures for anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 7, e33199

Traczewski P, Rudnicka L (2008): Adalimumab in dermatology. *Br J Clin Pharmacol* 66, 618-625

Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ (1993): The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol* 101, 701-705

van de Putte LB, Atkins C, Malaise M, Sany J, Russell AS, van Riel PL, Settas L, Bijlsma JW, Todesco S, Dougados M et al. (2004): Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum Dis* 63, 508-516

van den Berg WB, McInnes IB (2013): Th17 cells and IL-17 A-Focus on immunopathogenesis and immunotherapeutics. *Semin Arthritis Rheum* 43, 158-170

Wallbrecht K, Drick N, Hund AC, Schön MP (2011): Downregulation of endothelial adhesion molecules by dimethylfumarate, but not monomethylfumarate, and impairment of dynamic lymphocyte-endothelial cell interactions. *Exp Dermatol* 20, 980-985

Weinberg A, Louzao R, Mussi-Pinhata MM, Cruz ML, Pinto JA, Huff MF, de Castro AC, Sucupira MC, Denny TN (2007): Quality assurance program for peripheral blood mononuclear cell cryopreservation. *Clin Vaccine Immunol* 14, 1242-1244

Yao Y, Richman L, Morehouse C, de los Reyes M, Higgs BW, Boutrin A, White B, Coyle A, Krueger J, Kiener PA et al. (2008): Type I interferon: potential therapeutic target for psoriasis? *PLoS One* 3, e2737

Zaba LC, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Nograles KE, Guttman-Yassky E, Cardinale I, Lowes MA, Krueger JG (2009): Effective treatment of psoriasis with etanercept is linked to suppression of IL-17 signaling, not immediate response TNF genes. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1022-1010 e1021-1395

Zollner TM, Asadullah K (2003): Selectin and selectin ligand binding: a bittersweet attraction. *J Clin Invest* 112, 980-983

Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits an folgenden Stellen publiziert:

Lockmann A, Schön MP (2013): Phenotypic and functional traits of peripheral blood mononuclear cells retained by controlled cryopreservation: implications for reliable sequential studies of dynamic interactions with endothelial cells. *Exp Dermatol* 22, 358-359

Die Verwendung von Abbildung 8 und 9 erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.

Lockmann A, Schön MP (2014): TNF α -induced leukocyte-endothelial cell interactions show marked inter-individual differences independent of the clinical response to adalimumab. *Exp Dermatol* 23, 133-135

Die Verwendung von Abbildung 7, 10, 11, 12, 13 und 14 erfolgte mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley & Sons A/S.

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Prof. M.P. Schön für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit, seine fachliche Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen aussprechen.

Weiterer Dank geht an Dr. K. Wallbrecht, die mich mit dem Projekt vertraut gemacht und mich eingearbeitet hat.

Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe Schön, die mich so freundlich empfangen und während der gesamten Durchführung des Projekts unterstützt hat. Insbesondere Dr. V. Lorenz und Dr. N. Pletz danke ich für ihre hilfreichen Tipps, Anleitungen sowie die inspirierenden Diskussionen. Des Weiteren vielen Dank an Dr. A. Braun, besonders in Bezug auf wertvolle Informationen zur FACS-Auswertung. A.-C. Hund danke ich für die gute, unkomplizierte und motivierende Zusammenarbeit sowie K. Kotzerke für die unzähligen (fachlichen) Diskussionen und die stetige Motivation. Ein Dankeschön auch an K. Zachmann, B. Messerschmidt und A. Bennemann, die das Labor am Laufen halten sowie an Dr. L. Erpenbeck, Dr. K. Amschler, S. Forkel und alle weiteren Labormitarbeiter.

Zudem danke ich D. Ellenberger für seine statistische Beratung sowie Dr. J. Mohr und PD Dr. R. Mößner für ihre Unterstützung bei der Auswahl und Akquirierung der Patienten.

Abschließend danke ich den Probanden und Patienten, die ihr Blut der Forschung zur Verfügung gestellt haben.

Veröffentlichte Arbeiten:

Lockmann A, Schön MP (2013): Phenotypic and functional traits of peripheral blood mononuclear cells retained by controlled cryopreservation: implications for reliable sequential studies of dynamic interactions with endothelial cells. *Exp Dermatol* 22, 358-359

Brehmer F, Zutt M, **Lockmann A**, Schön MP, Thoms K-M (2013): Nd:YAG laser epilation to prevent recurrences after pilonidal sinus surgery. *J Dtsch Dermatol Ges* 11, 1203-1205

Lockmann A, Brehmer F, Hofmann L, Wolff C, Emmert S, Schön MP, Brauns B, Haenssle HA (2013): Brown macule with parallel ridge pattern on the palm of a 58-year-old woman. *Hautarzt* 64, 946-948

Brehmer F, **Lockmann A**, Wolff C, Hofmann L, Schön MP, Emmert S, Haenssle HA (2014): Grouped vesicles with brown background pigmentation on the abdomen of a 9-year-old girl. *J Dtsch Dermatol Ges* 12, 362-364

Lockmann A, Schön MP (2014): TNF α -induced leukocyte-endothelial cell interactions show marked inter-individual differences independent of the clinical response to adalimumab. *Exp Dermatol* 23, 133-135

Wolff CR, Brehmer F, **Lockmann A**, Hofmann L, Brauns B, Schön MP, Emmert S, Haenssle HA (2014): Rapidly growing blue-red nodule on the cheek of a 4-year-old boy. *J Dtsch Dermatol Ges* 12, 432-434

Haenssle HA, Hoffmann S, Holzkamp R, Samhaber K, **Lockmann A**, Fliesser M, Emmert S, Schön MP, Rosenberger A, Buhl T (2014): Melanoma thickness: the role of patients' characteristics, risk indicators and patterns of diagnosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* [Epub ahead of print]