

---

# **BACHELORARBEIT**

---

Frau  
**Miriam Fritzsche**

**Etablierung eines T-Zell und  
MDSC Antikörper Panels für  
Blut- und Gewebeproben von  
Psoriasis vulgaris Patienten**

Mittweida, 2022



Fakultät für Angewandte Computer- und  
Biowissenschaften

---

## **BACHELORARBEIT**

---

# **Etablierung eines T-Zell und MDSC Antikörper Panels für Blut- und Gewebeproben von Psoriasis vulgaris Patienten**

Autor:  
**Frau**

**Miriam Fritzsche**

Studiengang:  
**Biotechnologie**

Seminargruppe:  
**BT19w-MB**

Erstprüfer:  
**Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers**

Zweitprüfer:  
**Dr. rer. nat. Melanie Carevic-Neri**

Einreichung:  
**Berlin, 14. 11. 2022**

Verteidigung/Bewertung:  
**Mittweida, 2022**

### **Bibliographische Beschreibung:**

Fritzsche, Miriam:

Etablierung eines T-Zell und MDSC Antikörper Panels für Blut- und Gewebeprobe von Psoriasis vulgaris Patienten. November 2022.

Verzeichnisse S. I-V

Inhalte S. 1-45

Anhänge S. VI-XV

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät für Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2022

### **Englischer Titel**

Establishment of a T-cell and MDSC antibody panel for blood and tissue samples from psoriasis vulgaris patients.

### **Kurzbeschreibung:**

In dieser Bachelorarbeit wird ein Antikörper Panel für T-Zellen und MDSCs erstellt, um die Funktionsweise der Erkrankung einer Psoriasis vulgaris definieren zu können. Für die Untersuchung der vorhandenen Zelltypen in Blut- und Gewebeprobe der Patienten werden zuvor die benötigten Antikörper für eine Fluoreszenz Durchflusszytometrie auf ihre optimale Konzentration, mittels Titration, hin analysiert. Zudem wird eine Kompensation, mit den Antikörpern in richtiger Konzentration, durchgeführt. Aus Blutproben von Patienten werden schließlich PBMCs und aus Gewebeprobe Immunzellen isoliert. Abschließend werden die gewonnenen Zellen mit den Antikörpern gefärbt und eine Durchflusszytometrie angeschlossen.

## **Danksagung**

Ich möchte meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt haben und mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben.

Auch möchte ich meiner Betreuerin an der Charité Frau Carevic-Neri danken, für das Möglichmachen der Bachelorarbeit und für das Zeigen verschiedener Labormethoden neben der Bachelorarbeit.

**Inhaltsverzeichnis**

**Inhaltsverzeichnis .....I**

**Abbildungsverzeichnis.....III**

**Tabellenverzeichnis .....IV**

**Abkürzungsverzeichnis ..... V**

**1 Einleitung..... 1**

    1.1 Das Immunsystem..... 1

        1.1.1 T-Zellen ..... 2

        1.1.2 Myeloide Suppressorzellen..... 3

    1.2 Die Entzündungserkrankung Psoriasis ..... 4

    1.3 Psoriasis Therapie ..... 5

    1.4 Detektion verschiedener Zelltypen mittels Durchflusszytometrie..... 6

**2 Zielstellung ..... 8**

**3 Material..... 9**

    3.1 Chemikalien ..... 9

    3.2 Medien ..... 9

    3.3 Molekularbiologische Reagenzien..... 9

    3.4 Material..... 10

    3.5 Geräte..... 11

    3.6 Software ..... 11

**4 Methoden ..... 12**

    4.1 Etablierung eines Antikörperpanels..... 12

        4.1.1 Antikörpertitration ..... 12

        4.1.2 Kompensation ..... 14

    4.2 PBMC-Isolation aus Blutproben..... 15

    4.3 Leukozytenisolation aus menschlichen Gewebeproben ..... 16

    4.4 Antikörperfärbung und Fluoreszenz Durchflusszytometrie ..... 17

    4.5 Gating Strategie ..... 17

        4.5.1 Gating Strategie für T-Zellen..... 18

        4.5.2 Gating Strategie für MDSCs..... 19

    4.6 Probenentnahme bei Psoriasis Patienten..... 20

**5 Ergebnisse..... 21**

5.1 Antikörpertitration .....	21
5.2 Überprüfung der Kompensation .....	23
5.3 Octodissociator Programme für die Leukozyten-Isolation aus Gewebeproben ...	25
5.4 Blut- und Gewebeanalyse von Psoriasis vulgaris Patienten .....	28
5.4.2 Ergebnisse der T-Zell Analyse .....	28
5.4.2 Ergebnisse der MDSC-Analyse .....	31
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>34</b>
6.1 Ein Antikörper Panel für die Überprüfung von T-Zellen und MDSCs mittels Durchflusszytometrie .....	34
6.2 Erprobung der Leukozytenisolation aus Gewebeproben .....	36
6.3 T-Zell Vorkommen bei Psoriasis Patienten .....	38
6.4 MDSC Vorkommen bei Psoriasis Patienten .....	39
6.5 T-Zellhemmung durch MDSCs .....	40
<b>7 Ausblick .....</b>	<b>42</b>
<b>8 Zusammenfassung .....</b>	<b>44</b>
<b>9 Summary .....</b>	<b>45</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>X</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>XV</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: MDSC-Differenzierung während der Tumorentwicklung .....	4
Abbildung 2: Psoriasis Plaque an der Hand ohne Therapie (Tag 0) und unter Therapie mit Anthralin.....	6
Abbildung 3: Gating von Granulozyten, Einzelzellen, lebenden Zellen und HLA-DR negativen Zellen.....	19
Abbildung 4: Gating Strategie für PMN-MDSCs und M-MDSCs.....	20
Abbildung 5: MDSC Antikörper Titration .....	22
Abbildung 6: Gating von Immunzellen sowie anschließendes Gating der Einzelzellen und lebenden Zellen aus einer Psoriasis Blutprobe. ....	24
Abbildung 7: Gating von Tregs und T-Helferzellen Subpopulationen aus einer Psoriasis Blutprobe. ....	25
Abbildung 8: Zellisolation mit dem Octodissociator für 30 min und 1628 rpr .....	26
Abbildung 9: Zellisolation mit dem Octodissociator für 1h und 1998 rpr .....	27
Abbildung 10: Zellisolation mit dem Octodissociator für 1h 30 min und 2332 rpr .....	28
Abbildung 11: T-Zell Gating bei Patient 1 zum 1. und 2. Zeitpunkt aus Blutproben ....	29
Abbildung 12: T-Zell Gating bei Patient 1 zum 1. und 2. Zeitpunkt aus einer Gewebeprobe .....	30
Abbildung 13: T-Zell Gating bei Patient 2 zum 1. und 2. Zeitpunkt aus Blutproben ....	31
Abbildung 14: MDSCs bei Blutabnahme am 1. und 2. Zeitpunkt von Patient 1.....	32
Abbildung 15: MDSCs bei Blutabnahme am 1. und 2. Zeitpunkt von Patient 2.....	32
Abbildung 16: Gating von Granulozyten.....	XI
Abbildung 17: Gating von Lymphozyten und Monozyten.....	XI
Abbildung 18: T-Zell Antikörper Titration. ....	XII
Abbildung 19: HLA-DR und CD15/CD14 Gating bei Blutabnahme am 1. und 2. Zeitpunkt von Patient 1 .....	XIV
Abbildung 20: HLA-DR und CD15/CD14 Gating bei Blutabnahme am 1. und 2. Zeitpunkt von Patient 2.....	XIV



**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Antikörper für die Titration mit Angabe der Hersteller und Test-  
 Konzentrationen ..... 14

Tabelle 2: Anteile der PMN- und M-MDSCs von Patient 1 und 2 an allen lebenden  
 Zellen. .... 33

Tabelle 3: Ausgewählte Antigene und zugehörige exprimierende Zelltypen..... X

Tabelle 4: Ausgewählte Konzentrationen zum Markieren der isolierten Zellen nach  
 Titration ..... XIII

**Abkürzungsverzeichnis**

CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA-DR	human leukocyte antigen-DR isotype
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
M-MDSC	monocytic-myeloid-derived suppressor cell
PBS	phosphate-buffered saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PMN-MDSC	polymorphonuclear-myeloid-derived suppressor cell
qPCR	quantitative Polymerase chain reaction
RPM	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPR	rounds per run
RT	Raumtemperatur
SNP	single nucleotide polymorphism
Th1	Typ 1 T-Helferzelle
Th2	Typ 2 T-Helferzelle
Th17	Typ 17 T-Helferzelle
Th17.1	Typ 1 ähnliche Typ 17 T-Helferzelle
Tfh	follikuläre T-Helferzelle
Treg	regulatorische T-Zellen
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$

## **1 Einleitung**

Diese Bachelorarbeit soll sich mit der Etablierung eines Antikörper Panels für T-Zellen myeloide Suppressorzellen (MDSC) beschäftigen, welche wichtig sind für die Analyse von weißen Blutkörperchen in Psoriasis vulgaris Blut- und Gewebeproben. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie werden diese Zelltypen während der Erkrankung beobachtet. Die Antikörper besitzen dabei spezifische Paratope gegen Antigene auf diesen Zellen. Zur Überprüfung des Panels nach Abschluss der Etablierung wird die Veränderung der unterschiedlichen Zelltypen in zwei Patienten vor und unter Therapie der Krankheit beobachtet. Die Behandlung erfolgt dabei mit Anthralin, einem Medikament dessen Wirkungsweise noch nicht vollständig geklärt ist und deshalb weiteren Untersuchungen bedarf. Die Etablierung dieses umfangreichen Antikörper-Panels ist aus diesem Grund besonders wichtig, da in Zukunft eine Studie durchgeführt werden soll, in der eine Gruppe von Patienten unter Therapie auf zellulärer Ebene genau untersucht werden soll, um Aufschluss über die Wirkungsweise von Anthralin zu bekommen.

### **1.1 Das Immunsystem**

Die Abwehr körperfremder Moleküle und Mikroorganismen ist die Aufgabe des Immunsystems. Die Abwehr wird in unspezifisch, auch angeborene Immunantwort genannt, und spezifisch, alias erworbene Immunantwort, unterteilt. Beide Arten werden mit Hilfe der weißen Blutzellen, auch Leukozyten genannt, realisiert. Diese Zellen stammen zumeist aus dem Knochenmark und leiten sich aus Vorläuferzellen aller Blutzellen, also auch roter Blutkörperchen und Blutplättchen, den Hämatopoetischen Stammzellen, ab. Diese Stammzellen differenzieren sich zum einen in lymphatische Vorläuferzellen, welche die lymphatische Zelllinie der Leukozyten ausbilden, darunter natürliche Killerzellen, T- und B-Zellen. Des Weiteren werden myeloische Vorläuferzellen gebildet, aus denen weitere Typen von Leukozyten sowie Vorläuferzellen für Erythrozyten und Blutplättchen entstehen. Leukozytenarten aus der myeloischen Zelllinie umfassen unter anderem Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen. Gereifte Zellen können dann in Blut, in peripheres Gewebe oder in das Lymphsystem übergehen (Murphy & Weaver, 2018).

Die angeborene Immunantwort richtet sich gegen Pathogene jeglicher Art und ist innerhalb von kurzer Zeit aktiv. Bestandteile dieser Abwehr sind die Schleimhäute, das

Komplementsystem, Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen, die durch Phagozytose oder Sezernierung toxischer Substanzen die fremden Strukturen abtöten. Die erworbene Immunantwort beruht auf der Erkennung von Antigenen fremder Zellen. Antigene sind Strukturen, meist Proteine, aber auch Nucleinsäuren oder Polysaccharide, welche eine Aktivierung der erworbenen Immunantwort hervorrufen. Dabei wird zusätzlich in zelluläre und humorale Immunantwort unterteilt. Bei der zellulären Antwort werden T-Lymphozyten aktiviert durch spezifische Bindung an Antigene. Die humorale hingegen beinhaltet die Aktivierung von B-Lymphozyten, welche sich schließlich in Plasmazellen differenzieren und Immunglobuline, auch Antikörper genannt, produzieren, welche unter anderem die Phagozytose der Pathogene ermöglichen. Die erkannten Antigene sind normalerweise körperfremd. Es kann jedoch passieren, dass körpereigene Verbindungen die Produktion von Antikörpern auslösen, dann wird von Autoimmunerkrankungen gesprochen. Die Ursachen für eine solche Überaktivität des Immunsystems sind größtenteils unklar. Möglich wären genetische Veranlagungen. Auch könnten Ähnlichkeiten zwischen den körpereigenen Strukturen und bakteriellen vorliegen und so als Auslöser fungieren (Löffler, 2008).

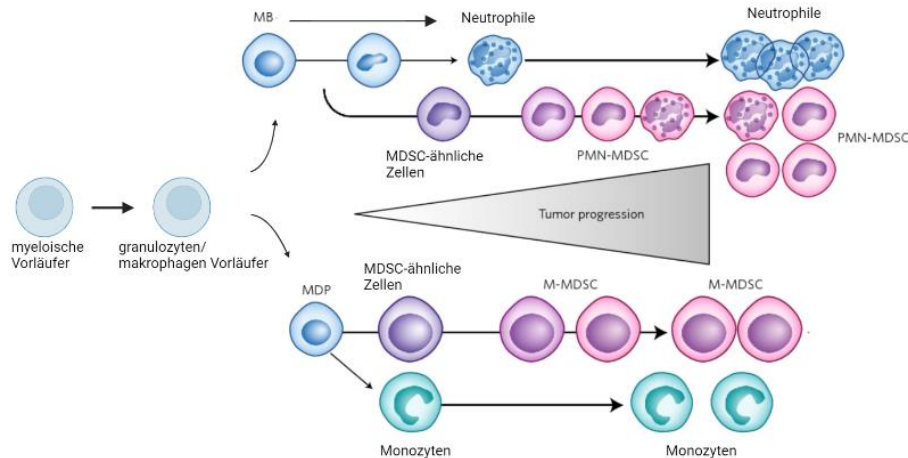
### **1.1.1 T-Zellen**

T-Zellen spielen im Zusammenhang mit Psoriasis eine große Rolle, wie im späteren Kapitel noch genauer erklärt wird. T-Zellen, genauer T-Lymphozyten, sind Teil des Immunsystems und werden im Knochenmark gebildet. Danach wandern sie zum Thymus zur Reifung und gelangen anschließend in die Peripherie. Arten von T-Zellen sind naive T-Zellen, welche auf neue Antigene reagieren können, also noch nicht aktiviert sind, T-Gedächtniszellen, welche durch frühere Antigenaktivierung entstanden sind und die Langzeit-Immunität erhalten, und regulatorische T-Zellen, sie sind an der Regulierung von Immunantworten beteiligt. Durch Kontakt mit Antigenen werden die T-Zellen aktiviert, was wiederum in Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen bzw. zytotoxischen T-Zellen resultiert, welche unter anderem Zytokine ausschütten können (Kumar, Connors, & Farber, 2018). Zytokine sind kleine segregierte Proteine. Sie werden von Zellen ausgeschüttet und haben verschiedene spezifische Effekte auf die Interaktion und Kommunikation zwischen Zellen. Zytokine können andere Zellen des Immunsystems, wie etwa B-Zellen, aktivieren, welche wiederum Pathogene beseitigen

können. Unter den Begriff Zytokine fallen Lymphokine, Monokine, Chemokine und Interleukine. Eine wichtige Rolle in der Entstehung von Entzündungen spielen proinflammatorische, also Entzündungsfördernde, Zytokine, wie Tumor-Nekrose-faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin-6 (IL-6). Auf der anderen Seite gibt es antiinflammatorische Zytokine, welche proinflammatorische Zytokine kontrollieren können (Zhang & An, 2007).

### **1.1.2 Myeloide Suppressorzellen**

Ein weitere Zellpopulation, die in dieser Arbeit thematisiert wird, sind myeloide Suppressorzellen. MDSCs sind eine Population unreifer myeloischer Zellen. Sie wurden vermehrt in Krebspatienten, aber auch in Mäusen mit transplantierten oder spontan entstandenen Tumoren gefunden. In Krebspatienten konnte die Charakterisierung über die Expression bestimmter Oberflächenmarker erfolgen. So sind menschliche MDSCs typischerweise  $CD11b^+CD33^+CD34^+CD14^-HLA-DR^-$  (Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2020). Neben Krebs, kommen MDSCs ebenso in chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und weiteren Krankheiten vor (Bronte, et al., 2016). Es wird hauptsächlich zwischen zwei Arten von MDSCs unterschieden. So wird zwischen monozytischen (M)-MDSCs, die sich aus Monozyten Vorläufern ableiten, und polymorphnuklearen (PMN)-MDSCs, auch granulozytische MDSC da sie sich aus Granulozyten Vorläufern ableiten, unterschieden (Aarts & Kuijpers, 2018). Der Phänotyp der M-MDSCs ähnelt, wie der Name impliziert, dem der Monozyten. Die PMN-MDSCs den zur Granulozyten-Familie gehörenden Neutrophilen. Die MDSC-Differenzierung ist in Abbildung 1 nachzuvollziehen. MDSCs besitzen eine T-Zell supprimierende Wirkung, was sie von Monozyten und Neutrophilen unterscheidet. Die T-Zell supprimierende Wirkung, allgemein auch als Immunsuppressive Wirkung bezeichnet, könnte ein Zeichen auf die Hauptaufgabe der der MDSCs liefern. So könnte ihre Aufgabe in Entzündungen und Infektion die der Bewahrung von geschädigten Gewebe vor größeren Schäden sein, welche durch unkontrollierte Immunantworten ausgelöst wurden (Bronte, et al., 2016).



**Abbildung 1: MDSC-Differenzierung während der Tumorentwicklung**

Myeloblasten (MB), Vorläufer von Monozyten und dendritischen Zellen (MDP), myeloide Suppressorzellen (MDSC), polymorphnukleare (PMN)- und mononukleare (M)-MDSCs  
 Quelle: basierend auf Veglia, Perego, & Gabrilovich, 2017

## 1.2 Die Entzündungserkrankung Psoriasis

Psoriasis stellt eine chronisch entzündliche Hauterkrankung dar. An dieser Krankheit leiden rund 2-3 % der Bevölkerung weltweit. Zumeist betrifft es Menschen im Alter von rund 20-30 Jahren. Die verbreitetste Art der Psoriasis ist Psoriasis vulgaris, auch Plaque Psoriasis genannt, und macht 80-90 % aller Psoriasis Patienten aus. Die Erkrankung zeigt sich als rote, schuppige klar definierte Plaques. Dabei findet eine Verdickung der äußeren Epidermis (Hyperkeratose) statt. In Abbildung 2 ist eine betroffene Hautstelle zusehen (Vgl. erstes Bild). Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei mögliche Ursachen für die Entstehung einer Psoriasis bekannt. Zum ersten wären dies genetische Ursachen. In früheren Studien wurden Gen Polymorphismen gefunden, welche in Verbindung mit Immun- und Hautbarriere Funktionen stehen. Kinder mit einem Psoriasis betroffenen Elternteil haben eine höhere Wahrscheinlichkeit die Erkrankung ebenfalls zu besitzen im Vergleich mit Kindern ohne Elternteil mit Psoriasis. Dabei wurden mehr als 30 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) identifiziert, welche mit der Entstehung von Psoriasis zusammenhängen. Ein zweiter Auslöser könnten Umweltfaktoren darstellen, wie physische Verletzungen, bestimmte Medikamenteneinnahmen, Infektionen, aber auch Stress, Alkohol- und Nikotinkonsum sowie Übergewicht. Ein verändertes Hautmikrobiom kann ebenfalls eine Ursache der Psoriasis sein. In Psoriasis betroffener Haut konnte bereits eine erhöhte bakterielle Vielfalt und von gesunder Haut abweichende Pilzvorkommen aufgezeigt werden. Ein verändertes Mikrobiom kann dabei auch

wiederum verschiedene Auslöser besitzen, wie Alter, Hygiene oder Klima (Ayala-Fontánez, Soler, & McCormick, 2016).

Auf zellulärer Ebene ist die Psoriasis charakterisiert durch eine erhöhte Proliferation epidermaler Keratinozyten und Proliferation dermalen Endothelzellen. Ebenso zeichnet sich die Krankheit im Auftreten von Neutrophilen und der Infiltration von mononuklearen Zellen in die Epidermis aus. Mononukleare Lymphozyten, wie T-Zellen und dendritische Zellen, infiltrieren zudem die Dermis (Lowe, Bowcock, & Krueger, 2007). Speziell die Aktivierung der T-Zellen spielt eine sehr wichtige Rolle in der Pathogenese der Psoriasis. Auch die von diesen T-Zellen segregierten proinflammatorischen Zytokine sind von Bedeutung. Psoriasis wird als T-Zell gesteuerte Entzündungserkrankung angesehen, darunter besonders von Typ 1 (Th1) und Typ 17 (Th17) T-Helferzellen, welche in diesem Fall überreguliert sind. Das heißt, dass die Psoriasis auch als Autoimmunerkrankung angesehen werden kann. Diese Erkenntnis geht der Untersuchung von Plaques und peripheren Blutproben von Psoriasis Patienten hervor, dabei konnten eine große Menge CD4<sup>+</sup> Th1 und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen detektiert werden sowie proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-12 welche für eine Th1 gesteuerte Krankheit sprechen. Ebenfalls involviert in der Entstehung von Psoriasis scheinen CD4<sup>+</sup> Th-Zellen zu sein welche IL-17 produzieren. IL-17 wird von Th17-Zellen segregiert. Dies spricht dafür, dass die Psoriasis ebenso von Th17-Zellen gesteuert wird (Cai, Fleming, & Yan, 2012). Die Untersuchung der T-Zelltypen wird in dieser Arbeit einen großen Teil ausmachen.

### **1.3 Psoriasis Therapie**

Es wurden bereits einige Therapien gegen Psoriasis etabliert. Dabei kommen häufig systemische Therapien, zum Beispiel mit Cyclosporin, und Phototherapien zum Einsatz. Diese sind jedoch in ihrer Effektivität limitiert, da sie unter anderem bei Nutzung über längere Zeiträume zu toxischen Wirkungen in Organen führen und Interaktionen mit anderen Wirkstoffen auftreten können. Neben diesen traditionellen Therapien haben sich in den letzten Jahren biologische Therapien, sogenannte Biologika, als vielversprechend gezeigt. So konnten durch das bessere Verständnis in der Entstehung der Psoriasis bezüglich T-Lymphozyten und Zytokinen gegen eben diese Behandlungen entwickelt werden. Es wurden zum Beispiel IL-23 Inhibitoren entwickelt, wie Drakizumab. Ebenso erwies sich die Inhibierung des Th17 Signalweges mit Hilfe von monoklonalen

Antikörpern als erfolgreich (Vide & Magina, 2017). Eine weitere sehr effiziente Behandlung stellt die topische Therapie mit Anthralin, auch Dithranol genannt, dar, welche meist eine Besserung der Erkrankung nach nur zwei Wochen aufzeigt (Holstein, et al., 2017).

Die Behandlung zweier Psoriasis Patienten in dieser Arbeit wird mit Anthralin erfolgen. Die Wirkung von Anthralin ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Die Besonderheit, welche sich in der Behandlung der Psoriasis mit Anthralin zeigt, ist, dass sich die Hautrötungen und Entzündung vorerst verschlimmern, bevor eine Besserung eintritt. Zu sehen in Abbildung 2. Zudem zeigten sich ebenso Irritationen auf gesunder Haut in Kontakt mit Anthralin. Bekannt ist, dass Anthralin eine Reduktion epidermaler Proliferation hervorruft, wobei die Anzahl von Lymphozyten und Langerhans Zellen unverändert bleibt. Bei gesunder Haut jedoch zeigte sich eine verstärkte epidermale Proliferation und eine steigende Anzahl an T-Lymphozyten und Langerhans Zellen (Holstein, et al., 2017). Eine Studie an Mäusen konnte die Expression von *CXcl1* und *S100a8/9* durch Behandlung der Haut mit Anthralin nachweisen. Dies sind Faktoren welche bekannt sind MDSC-Populationen anzuziehen (Benezeder, et al., 2020). Da in dieser Arbeit Patienten mit Anthralin behandelt werden, soll die Analyse der Patientenproben kurz thematisiert werden.



**Abbildung 2: Psoriasis Plaque an der Hand ohne Therapie (Tag 0) und unter Therapie mit Anthralin**  
Quelle: eigene Darstellung

#### **1.4 Detektion verschiedener Zelltypen mittels Durchflusszytometrie**

Die Zellanalyse mit einem Durchflusszytometer wird ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit sein, um die zuvor genannten T-Zellen und MDSCs ausfindig machen zu können. Die Identifizierung verschiedener Zelltypen und die Untersuchung ihrer Beschaffenheit sind wichtiger Bestandteil in der Immunologie. Mit Hilfe eines Durchflusszytometers lassen sich hierbei Zellen anhand ihrer Größe, ihrer Oberflächeneigenschaften und



intrazellulärer Zusammensetzung voneinander trennen. Die Zellen befinden sich dabei in einem Flüssigkeitsstrom und werden einzeln von einem Laserstrahl erfasst. Es kommt zu einer Lichtstreuung. Unterschieden wird hier in Vorwärtstreulicht, auch Forwardscatter (FSC) genannt, welches Aussagen über die Größe der vorliegenden Zelle macht. Darüber hinaus gibt es noch das Seitwärtstreulicht, auch Sidescatter (SSC) genannt, welches im 90°-Winkel abgestrahlt wird und Informationen über die Zellgranularität liefert. Neben Größe und Granularität können auch zelluläre Strukturen untersucht werden. Dabei werden Oberflächenmarker auf Zellen meist mit Antikörpern, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, markiert. Diese Farbstoffe können mit Lasern angeregt werden und deren emittierte Wellenlänge, welche sich je nach verwendetem Fluorochrom ändern kann, ermittelt (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, 2009). Innerhalb dieser Arbeit werden jedoch mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zum Einsatz kommen. Dadurch kann jedoch das Problem von spektralen Überlappungen auftreten, d.h. dass sich Emissionswellenlängenbereiche der Farbstoffe überschneiden können und so zu falsch positiven Signalen in einem Wellenlängen Detektor führen kann (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, 2009). Durch eine sogenannte Kompensation, vor dem eigentlichen Experiment, können Signale eines Fluorochroms in einem falschen Detektor erkannt und eliminiert werden (Bio-rad 2, 2022). Eine solche Kompensation wird auch in dieser Arbeit durchgeführt werden.

## **2 Zielstellung**

Innerhalb dieser Bachelorarbeit soll ein Antikörper Panel für T-Zellen und MDSCs mit 18 unterschiedlichen Fluochromen erstellt werden, um die zellulären Veränderungen einer Psoriasis vulgaris, auch im Hinblick der Behandlung mit Anthralin, genauer definieren zu können. Für die Untersuchung der vorhandenen Zelltypen in Blut- und Gewebeproben der Patienten sollen zuvor die benötigten Antikörper für eine Fluoreszenz Durchflusszytometrie auf ihre optimale Konzentration, mittels Titration, hin analysiert werden. Zudem soll eine Kompensation, mit den Antikörpern in richtiger Konzentration, durchgeführt werden. Aus Blutproben von Patienten sollen schließlich PBMCs und aus Gewebeproben Leukozyten isoliert werden. Die gewonnenen Zellen sollen abschließend mit den Antikörpern gefärbt und eine Durchflusszytometrie angeschlossen werden.

### **3 Material**

Nachfolgend werden die benötigten Materialien für alle Methoden und Experimente aufgezeigt.

#### **3.1 Chemikalien**

Trypanblaue Lösung 0,4%    gibco    LOT: 2244330

#### **3.2 Medien**

RPMI<sup>++</sup> Medium bestehend aus:

RPMI 1640 1x with L-glutamine	Corning	LOT: 18121002
1% Penicillin und Streptomycin	gibco	LOT: 2321137

FCS	Sigma Aldrich	LOT: 0001644044
RPMI 1640 1x without L-glutamine	gibco	LOT: 2425919
PBS pH 7.4 (10x)	gibco	LOT: 2491056

FACS Buffer bestehend aus:

PBS	(siehe oben)	
2 % FCS	(siehe oben)	
2 mM EDTA	Sigma Aldrich	LOT: K24001717 807
BioColl Trennlösung	Bio&Sell	LOT: BS.6750633

#### **3.3 Molekularbiologische Reagenzien**

Antikörper gegen:

HLA-DR	Becton Dickinson	LOT: 258499
CD3	Becton Dickinson	LOT: 170443
CD15	Beckman Coulter	LOT: 200028
CD45	Beckman Coulter	LOT: 200082
CD11b	Becton Dickinson	LOT: 50352
CXCR5	Becton Dickinson	LOT: 308970
CCR4	Becton Dickinson	LOT: 308981

CXCR3	Beckman Coulter	LOT: 200020
CD25	Beckman Coulter	LOT: 7619058
CRTH2	Beckman Coulter	LOT: 200039
CD4	BioLegend	LOT: B310100
CD14	Beckman Coulter	LOT: 200038
CD33	Beckman Coulter	LOT: 200049
CCR6	Beckman Coulter	LOT: 200025
CD127	Biolegend	LOT: B291576
ICOS	Beckman Coulter	LOT: 200019
CD45RA	Beckman Coulter	LOT: 200020
Viakrome 808 Fixability Dye	Beckman Coulter	LOT: 200005
Zombie Aqua Fixable	Biolegend	LOT: B351522
DNase I	Sigma Aldrich	LOT: 0001533247
Collagenase IV	Sigma Aldrich	LOT: 0000145686

### 3.4 Material

menschliche Blutproben

menschliche Gewebeproben

PBMC-Isolation:

EDTA-Blutröhrchen BD Vacutainer K2E (EDTA) - BD

Serologische Pipetten - Falcon

Pasteurpipetten aus Polyethylen - Assistent

Neubauer-Zählkammer - Marienfeld

Polypropylene Conical Tubes - Falcon

Gewebeisolation:

Schere

Glaspetrischale

GentleMACS(TM) C-Tubes - Miltenyi Biotec

Spritzen Omnifix-F 1ml - B.Braun

Zellsieb 40µm - Sarstedt

## Cytoflexanalysen:

Mikroreaktionsgefäße	- eppendorf
5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube	- Falcon

**3.5 Geräte**

Clean Bench Herasafe	- Kendro
Zentrifuge Allegra X-30R	- Beckman Coulter
Mikroskop Axiovert135	- Zeiss
Vortexer Vortexgenie 2	- Scientific Industries
Heizblock Thermomixer compact	- eppendorf
gentleMACS Octo Dissociator	- Miltenyi Biotec
CytoFLEX-Durchflusszytometer	- Beckman Coulter

**3.6 Software**

CytExpert - Beckman Coulter

## **4 Methoden**

Die Untersuchung von menschlichem Blut, von Psoriasis Patienten, auf T-Zellen und MDSCs erforderte zunächst die Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs). PBMCs kommen im peripheren Blut vor und sind Zellen mit rundem Zellkern. Dazu zählen Lymphozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen (Verhoeckx, et al., 2015). Auch die Isolation von Immunzellen aus Gewebeproben wurde durchgeführt. Für weiterführende Analysen mittels Durchflusszytometrie mussten die isolierten Zellen anschließend mit Antikörpern gefärbt werden. Im Vorfeld sollte dafür eine Kompensation durchgeführt werden, wofür die verwendeten Antikörper zuvor titriert wurden, um ihre optimale Einsatzkonzentration zu finden.

### **4.1 Etablierung eines Antikörperpanels**

Für die Durchflusszytometrie ist es von Vorteil die optimale Konzentration der zu nutzenden Antikörper zu verwenden. Zu hohe Volumina können zu unspezifischen Bindungen führen und so falsche Ergebnisse liefern (Hulspas, O'Gormon, Wood, Grataman, & Sutherland, 2009). Die jeweiligen Hersteller geben immer eine Konzentration für die Verwendung an, jedoch muss diese nicht immer optimal sein. Für die Etablierung des Panels sollten aus diesem Grund Antikörper titriert werden und in der anschließenden Durchflusszytometrie das bestmögliche Volumen ermittelt werden. Dabei wurden Antikörpern mit Paratopen gegen T-Zellen und Antikörper gegen MDSCs in das Panel aufgenommen, welche wichtig sind in der Untersuchung von Psoriasis Patienten. Die dabei angesteuerten Antigene und die zugehörigen Zelltypen, welche diese exprimieren, sind in Tabelle 3 im Anhang aufgelistet.

#### **4.1.1 Antikörpertitration**

Für die Titration wurden die Antikörper neben der vom Hersteller angegebenen Volumen auf weitere Volumina getestet. Die getesteten Volumina in  $\mu\text{l}$  sind in Tabelle 1 zu sehen. Es wurden Einzelfärbungen durchgeführt, das heißt jeder Antikörper wurde einzeln kontrolliert. Dazu wurde mit negativen und positiven Beads gearbeitet. Beads eignen sich besser als Zellen, da sie einheitlich sind und sich klar abgrenzen lassen durch ihre geringe Varianz. Zudem können positive Beads jegliche Antikörper binden (Goda & Szalóki,

2015). Deshalb können die Beads für alle Antikörper für die Titration genutzt werden und es müssen nicht verschiedene Zellen im Voraus isoliert werden, was wiederum größeren Aufwand bedeuten würde. Je ein Tropfen der positiven Beads wurde in Polystyrene Test Tubes, später nur als Tubes bezeichnet, getropft dazu jeweils ein Antikörper in einer Konzentration, welche getestet werden sollte. Dies wurde mit allen Antikörpern und deren Konzentrationen wiederholt. Zu beachten war dabei, dass für Konzentrationen unter einem  $\mu\text{l}$  Vorverdünnungen hergestellt wurden um möglich auftretende Pipettierfehler so gering wie möglich zu halten. So wurden für die zutreffenden Antikörper eine 1:10 Verdünnung hergestellt und aus dieser die entsprechenden Volumina entnommen. Die gefärbten Beads wurden anschließend 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden 500  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer hinzugefügt und 5 Minuten bei 4°C bei 400 x g zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 100  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert. FACS ist dabei lediglich die Abkürzung für Fluorescence activated cell sorting. Schließlich konnte die Analyse mittels Durchflusszytometrie erfolgen. Als Referenz wurde neben den Proben eine ungefärbte Probe, aus positiven und negativen Beads ohne Antikörper, ebenfalls im Durchflusszytometer aufgenommen und aufgezeichnet. Die ungefärbten Proben dienen dabei des Ausschlusses von Autofluoreszenz der Beads oder im weiteren Verlauf der der Zellen (Hulspas, O'Gormon, Wood, Grataman, & Sutherland, 2009).

**Tabelle 1: Antikörper für die Titration mit Angabe der Hersteller und Test-Konzentrationen**

<b>Antikörper gegen Epitop:</b>	<b>Volumen laut Hersteller [µl]</b>	<b>Titriervolumen [µl] ohne Verdünnung</b>
<b>HLA-DR</b>	<b>5</b>	<b>2, 1, 0.5, 0.2</b>
<b>CD3</b>	<b>5</b>	<b>*</b>
<b>CD15</b>	<b>10</b>	<b>10, 8, 2, 1</b>
<b>CD45</b>	<b>10</b>	<b>10, 8, 2, 1</b>
<b>CD11b</b>	<b>5</b>	<b>2, 1, 0.5, 0.2</b>
<b>CXCR5</b>	<b>5</b>	<b>*</b>
<b>CCR4</b>	<b>5</b>	<b>2, 1, 0.5, 0.2</b>
<b>CXCR3</b>	<b>10</b>	<b>10, 8, 5, 2</b>
<b>CD25</b>	<b>10</b>	<b>10, 8, 5, 2</b>
<b>CRTH2</b>	<b>20</b>	<b>20, 10, 8, 5, 2</b>
<b>CD4</b>	<b>5</b>	<b>2, 1, 0.5, 0.2</b>
<b>CD14</b>	<b>10</b>	<b>10, 8, 5, 2, 0.5</b>
<b>CD33</b>	<b>10</b>	<b>10, 8, 5, 2, 0.5</b>
<b>CCR6</b>	<b>10</b>	<b>10, 8, 5, 2</b>
<b>CD127</b>	<b>5</b>	<b>2, 1, 0.5, 0.2</b>
<b>ICOS</b>	<b>10</b>	<b>10, 8, 5, 3, 2</b>
<b>CD45RA</b>	<b>10</b>	<b>10, 8, 5, 2</b>

\* wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit titriert

Quelle: eigene Darstellung

Nach der Aufnahme aller Proben konnten sich die Diagramme im CytExpert Programm angezeigt werden lassen. Darüber wurden für alle Antikörper Dotplots erstellt, wobei der jeweilige Antikörper auf der x-Achse und FSC.A auf der y-Achse aufgetragen wurde. Um anschließend die negativen von den positiven Kolonien unterscheiden zu können wurde jeweils in der ungefärbten Probe eine Grenze gesetzt, welche auf die weiteren Plots mit Antikörpern übertragen wurde, um im Vergleich die positive Kolonie ausfindig zu machen.

#### **4.1.2 Kompensation**

Mit den zuvor ausgewählten Antikörperkonzentrationen wurde eine Kompensation durchgeführt. Dafür wurde ein neues Kompensationsexperiment in der CytExpert Software eröffnet und alle Antikörper mit Beads gemessen. Die Vorbereitung der Beads erfolgte wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Zusätzlich wurde eine ungefärbte Probe mit 100 µl Zellen einer gesunden Probe mitgeführt. Die Isolation dieser Zellen wird im folgenden Kapitel beschrieben. Ebenso wurden lebende und tote Zellen mittels Live Dead



Staining mit Zombie Aqua Dye kontrolliert, welches tote Zellen markiert. Tote Zellen können falsche Ergebnisse, durch ihre erhöhte Autofluoreszenz oder unspezifische Bindungen mit den Antikörpern, liefern und müssen deshalb in der späteren Cytoflexanalyse exkludiert werden (University of Iowa, 2022). Dazu wurden 100  $\mu$ l Zellen in einem Mikroreaktionsgefäß 15 Minuten bei 95°C auf einem Heizblock, zum Absterben der Zellen, inkubiert. Anschließend wurden diese kurz gekühlt durch Lagerung auf Eis und daraufhin 15  $\mu$ l frische lebende Zellen hinzu pipettiert und in ein Tube überführt. Die Lösung wurde abschließend mit 1  $\mu$ l Zombie Aqua gefärbt. Inkubation und Waschschrift erfolgte wie zuvor beschrieben, also gleichermaßen wie die der gefärbten Beads.

Nach Beenden der Kompensation wurden, zur abschließenden Überprüfung dieser, PBMCs einer Blutprobe eines Psoriasis Patienten mit allen Antikörpern und Zombie Aqua gefärbt. Die Färbung wird in Kapitel 4.4 genauer erklärt.

#### **4.2 PBMC-Isolation aus Blutproben**

Für die Isolation der PBMCs wurden zuerst die Blutproben in den Blutentnahmeröhrchen bei 350 x g und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Blutplasma abgenommen und in ein 15 ml Polypropylene Conical Tube, im weiteren Verlauf als Falcon bezeichnet, überführt. Die restlichen Blutbestandteile wurden danach in ein 50 ml Falcon mit sterilen Glaspasteurpipetten pipettiert. Das Blut wurde nun in einer 1:2 Verdünnung mit 20°C PBS vermischt. Um die PBMCs von anderen Zelltypen abzugrenzen, wurde daraufhin eine Dichtegradientenzentrifugation mit BioColl Trennlösung durchgeführt. Dafür wurde auf ein zuvor vorbereitetes 50 ml Falcon mit 15 ml Trennlösung die Blut-PBS Mischung vorsichtig überschichtet. Anschließend wurden die Falcons bei 400 x g für 30 Minuten bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde eine Schicht an der Schnittstelle sichtbar, welche die PBMCs enthielt. Diese Schicht wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein neues Falcon überführt und mit 4°C PBS auf 50 ml aufgefüllt und gemischt. Es schloss sich die Zentrifugation der Falcons bei 4°C für 10 Minuten bei 400 x g an. Der Überstand wurde darauf verworfen und das Pellet noch einmal mit einer geringen Menge 4°C PBS resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt. Ein weiteres Mal wurde bei 4°C und 400 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nun in RPMI<sup>++</sup> Medium resuspendiert

und mit einem Volumen von 12,5 ml RPMI<sup>++</sup> pro zwei Blutentnahmeröhrchen von zu Beginn hinzugegeben. Die Lebendzellzahl wurde durch Trypanfärbung mit einer Neubauer Zählkammer berechnet. Dafür wurden 15 µl Zellsuspension und 15 µl Trypanblau gemischt. Für anschließende Fluoreszenz-Durchflusszytometrie Analysen der Zellen wurde das benötigte Volumen an FACS-Puffer für 10 Millionen Zellen/ml berechnet durch Division der Gesamtlebendzellzahl durch 10 Millionen Zellen/ml. Danach wurde die Lösung ein letztes Mal für 10 Minuten bei 4°C und 400 x g zentrifugiert und im errechneten Volumen FACS-Puffer aufgenommen und resuspendiert.

### **4.3 Leukozytenisolation aus menschlichen Gewebeproben**

Neben der Isolation von Zellen aus Blutproben sind Gewebeproben eine gute Ergänzung, da hier die Entstehung von MDSCs direkt an der betroffenen Hautstelle analysiert werden kann. Für die Isolation sollte hierbei der Octodissociator von Myltenyi eingesetzt werden und zu Beginn unterschiedliche Programme getestet werden. Für diese Überprüfung wurde eine Gewebeprobe eines Akne Inversa Patienten genutzt.

Für die folgende Methodik wurden drei Gewebeproben eines Patienten mit einer Größe von je 3-6 mm verwendet.

Zu Beginn wurden 200 µl RPMI-Medium in eine Petrischale gegeben und die Probe hinzugegeben. Diese wurde mit Hilfe einer Schere in kleine Fragmente geschnitten, um die Oberfläche, für die folgende enzymatische Verdauung, zu vergrößern. Das Gewebe wurde anschließend in ein gentleMACS C-Tube überführt und Reste in der Petrischale und der Schere mit weiteren 2 ml RPMI gespült und ebenfalls in das C-Tube gegeben. Die Kollagenase, mit einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml, und die DNase, mit der Endkonzentration 1 µg/ml, wurden der Lösung hinzugegeben. Dann wurde das Tube in den Octodissociator platziert und gestartet.

Zum Vergleich wurden die drei Gewebeproben mit drei unterschiedlichen Programmen laufen gelassen. Ein Programm startete für 30 Minuten bei 1628 rpr, ein zweites für eine Stunde und 1998 rpr und das dritte Programm lief eine Stunde und 30 Minuten bei 2332 rpr.

Nach Programmende wurden die Tubes jeweils 5 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert, um die komplette Lösung am Boden zu sammeln. Die enzymatische Reaktion wurde

anschließend mit 5 ml RPMI<sup>+++</sup> + 10 % FCS gestoppt. Die Zellen wurden nun jeweils durch einen 40 µm Filter in ein weiteres Falcon Tube gefiltert, um eventuelle Gewebestückchen zu beseitigen. Der Filter wurde abschließend mit 2 ml RPMI<sup>+++</sup> + 10 % FCS gespült. Die Falcon Tubes wurden jeweils bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, dabei wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Für die anschließende Cytoflexanalyse wurden 100 µl als ungefärbte Probe und 100 µl als gefärbte Probe verwendet. Färbung und Analyse der Zellen erfolgte, wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

#### **4.4 Antikörperfärbung und Fluoreszenz Durchflusszytometrie**

Für die Durchflusszytometrie werden die zuvor isolierten PBMCs aus Blut in Tubes mit einem Volumen von je 100 µl, dies entspricht  $10^6$  Zellen, pro Tube überführt. Die Vorbereitung der Immunzellen aus Gewebe wurde zuvor beschrieben. Anschließend werden die Antikörper hinzu pipettiert. Dazu wurde im Vorfeld ein Mastermix mit allen Antikörpern in deren optimaler Konzentration hergestellt. Die Menge an Antikörper wurde mit FACS-Puffer auf 100 µl aufgefüllt und bis zum Gebrauch kühl und dunkel aufbewahrt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1400 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und schließlich mit 100 µl des Antikörper-Puffer-Mix resuspendiert. Nach Mischen der Zellen mit den Antikörpern wurden diese 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend mit 500 µl FACS-Puffer aufgefüllt und 5 Minuten bei 400 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin abgeschüttet und das Zellpellet mit 100-200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

#### **4.5 Gating Strategie**

Um über die Ergebnisse der Durchflusszytometrie verschiedene Zelltypen zu differenzieren ist es nötig bestimmte Zellpopulationen zu gaten. Gaten bedeutet hier so viel wie auswählen oder isolieren einer Population. In Diagrammen können über Zellpopulationen mit den gewünschten Eigenschaften Gates, also Grenzen, gesetzt werden. Zellen außerhalb des Gates werden exkludiert. Aus zuvor ausgewählten Zellen können so wiederum Subpopulationen identifiziert werden, indem diese Zellen auf andere Antikörperexpressionen hin analysiert werden. Durch Auftragen des FSC oder SSC,

ebenso durch Auftragen zweier detektierter Antikörper oder eine Kombination beider, innerhalb eines Diagramms beispielsweise als Dotplot, können bestimmte Zellen isoliert werden.

#### 4.5.1 Gating Strategie für T-Zellen

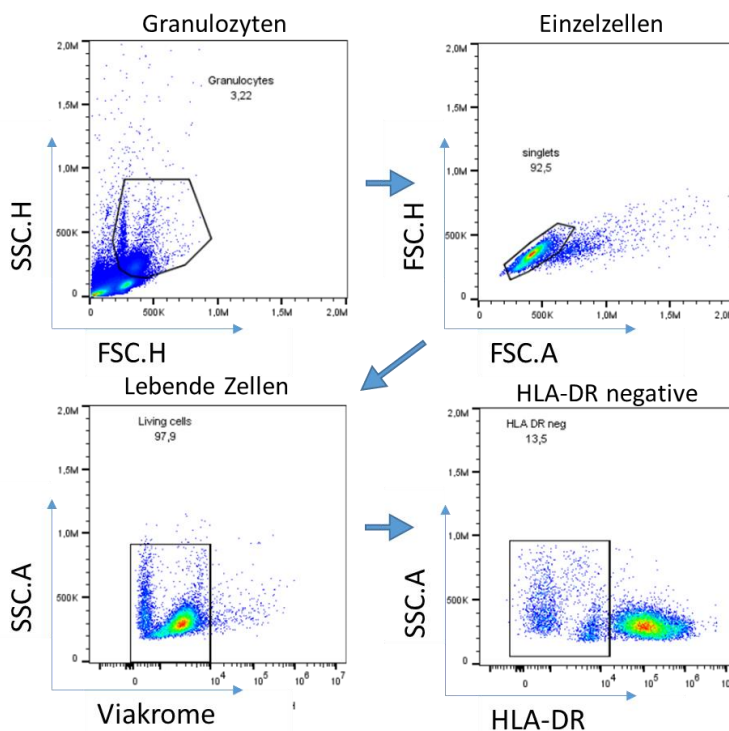
Wie in Kapitel 1.2 bereits beschrieben, ist Psoriasis vulgaris eine T-Zell gesteuerte Entzündungserkrankung, weshalb die Untersuchung dieser von großer Bedeutung ist und Aufschluss auf die Funktionsweise der Krankheit geben kann.

Für das T-Zell Gating wurden zuerst, mittels Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht, alle Lymphozyten (Vgl. Abb. 17 Anhang) ausgewählt. Danach wurden Einzelzellen (Singlets) inkludiert mit FSC.H gegen FSC.A. Doubletten wurden exkludiert, da sie falsche Ergebnisse in einer Zellsortierung liefern könnten. Besteht eine Doublette zum Beispiel aus einer negativen und positiven Zelle würde nur ein positives Signal erscheinen (Bio-rad 1, 2022). Anschließend wurden lebende Zellen mittels Viakrome auf der x-Achse und SSC.A auf der y-Achse ausgewählt. Viakrome färbt dabei tote Zellen. Aus den nun gewählten Zellen wurde die  $CD3^+$  und  $CD45RA^-$  Population durch Auftragen von CD3 auf der y-Achse und CD45RA auf der x-Achse eingegrenzt. CD4 gegen CXCR5 im Diagramm ließen anschließend das Auswählen der zwei  $CD4^+$  Populationen zu. Daraus konnten aus der negativen CXCR5 Population, auch T-Helferzellen (Th), regulatorische T-Zellen ( $CD25^+$  und  $CD127^-$ ) und die Subpopulationen Th17 ( $CCR6^+$  +  $CXCR3^-$ ), Th2 ( $CCR3^-$  +  $CXCR3^-$ ), Th1/17 Tfh ( $CCR3^+$  +  $CXCR3^+$ ) und Th1 ( $CCR6^-$  +  $CXCR3^-$ ), mittels CCR6 auf der y-Achse und CXCR3 auf der x-Achse, identifiziert werden. Aus der Population, welche positiv für CXCR5 ist, auch folliculäre T-Helferzellen, lassen sich ebenfalls die CCR6/CXCR3 Subpopulationen isolieren. Auch  $CD25^+$  und  $CD127^-$  können ausgewählt werden, welche Tfr1 (transferrin receptor-1)-Zellen darstellen.

In Abbildung 7 ist das T-Zell Gating vergleichend zu sehen. Das  $CXCR5^+$  ist dort nicht mit aufgeführt. Die Gating Strategien sind auf Grundlage des Papers von Holstein, et al., 2020 entstanden.

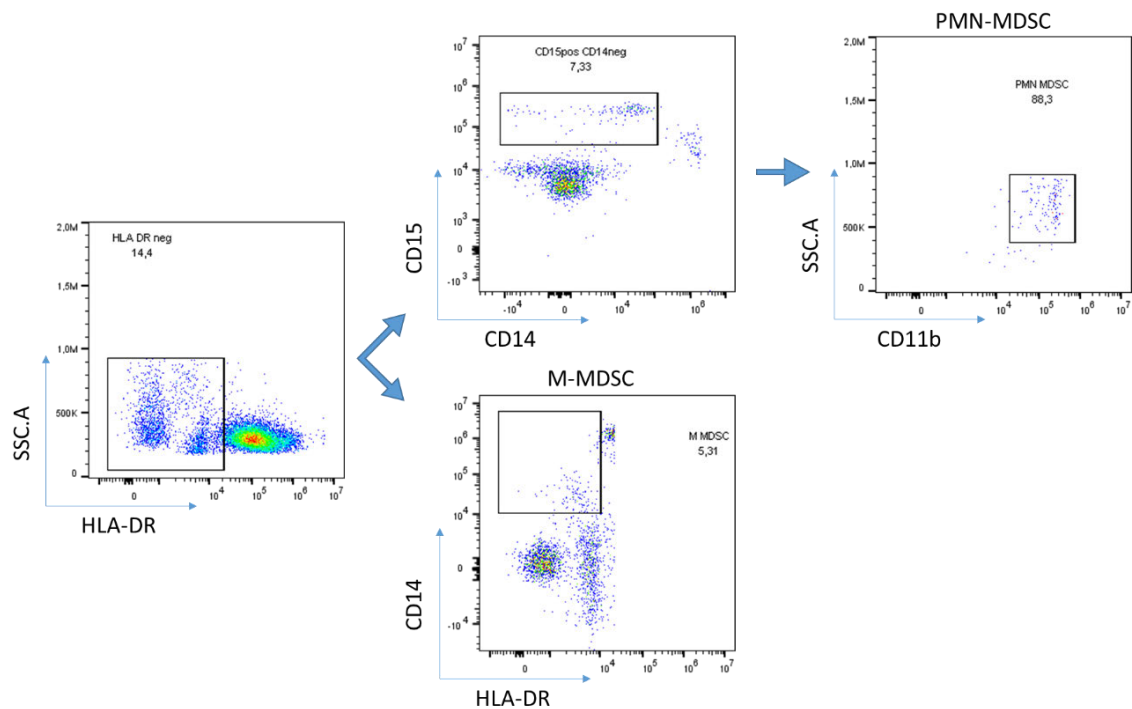
#### 4.5.2 Gating Strategie für MDSCs

Um MDSCs zu detektieren, wurden im ersten Schritt Granulozyten und Monozyten gated mit FSC.H auf der x-Achse und SSC.H auf der y-Achse. Einzelzellen und lebende Zellen wurden wie bei den T-Zellen gated. Anschließend wurden HLA-DR negative Zellen ausgewählt durch Auftragung von SSC.A gegen HLA-DR. Nachzuvollziehen ist dies in Abbildung 3.



**Abbildung 3: Gating von Granulozyten, Einzelzellen, lebenden Zellen und HLA-DR negativen Zellen**  
Quelle: eigene Darstellung

Im zweiten Schritt sollten nun aus den HLA-DR negativen Zellen M-MDSCs gated werden. Dafür wurde CD14 gegen HLA-DR im Diagramm ausgewählt, dabei stellen  $CD14^+$  und  $HLA-DR^-$  Zellen M-MDSCs dar. Für die Identifizierung von PMN-MDSCs wurden ebenso aus  $HLA-DR^-$  Zellen  $CD15^+$  und  $CD14^-$  gated und abschließend  $CD11b$  positive Zellen ausgewählt, welche die PMN-MDSCs darstellen, durch auftragen von SSC.A gegen  $CD11b$ , zu sehen in Abbildung 4. Die Gating Strategie ist mit Hilfe von Neri, et al., 2021 und Bronte, et al., 2016 entstanden.



**Abbildung 4: Gating Strategie für PMN-MDSCs und M-MDSCs**  
 Quelle: eigene Darstellung

#### 4.6 Probenentnahme bei Psoriasis Patienten

Innerhalb dieser Arbeit wurden Blutproben von zwei Psoriasis vulgaris Patienten entnommen und analysiert wie zuvor beschrieben. Auch wurde eine Akne Inversa Gewebeprobe genutzt. Alle teilnehmenden Patienten wurden im Voraus über die Nutzung ihrer Proben aufgeklärt und mussten ihr Einverständnis zur freiwilligen Teilnahme geben. Blut- und Gewebeproben der Patienten wurden von geschultem Personal entnommen. Dabei wurde an zwei Zeitpunkten Blut entnommen. Für den Psoriasis Patient 1 war dies am ersten Tag mit Anthralin und zu einem weiteren Zeitpunkt mit höherer Anthralinkonzentration. Diesem Patienten wurde zusätzlich eine Gewebeprobe an Tag 1 nach Behandlung der betroffenen Hautstelle entnommen. Zeitpunkt 1 bei Patient 2 war vor Behandlung und Zeitpunkt 2 unter Behandlung. Blut wurde zu beiden Zeitpunkten mit je zwei Blutröhrchen mit 10 ml entnommen. Gewebe wurde mittels Hautbiopsie entnommen, die entnommenen Proben hatten je eine Größe von rund 4 mm.

## **5 Ergebnisse**

Im folgenden Kapitel werden alle generierten Ergebnisse dargelegt. So erfolgte die Titration von Antikörpern und die Wahl des richtigen Volumens für weiterführende Analysen. Auch wurde die erstellte Kompensation mittels Gating verschiedener Zelltypen überprüft. Nach der Etablierung des Antikörperpanels wurden Blut und Gewebeproben von Psoriasis Patienten vor und unter einer Anthralin Therapie mittels Durchflusszytometrie untersucht.

### **5.1 Antikörpertitration**

Um die optimale Einsatzkonzentration der Antikörper für die Markierung der isolierten Zellen herauszufinden, wurden verschiedene Volumina getestet. Pseudo Color Plots zu allen Antikörpern und deren verschiedenen Konzentrationen sind in Abbildung 5 und 18 (Anhang) zu sehen.

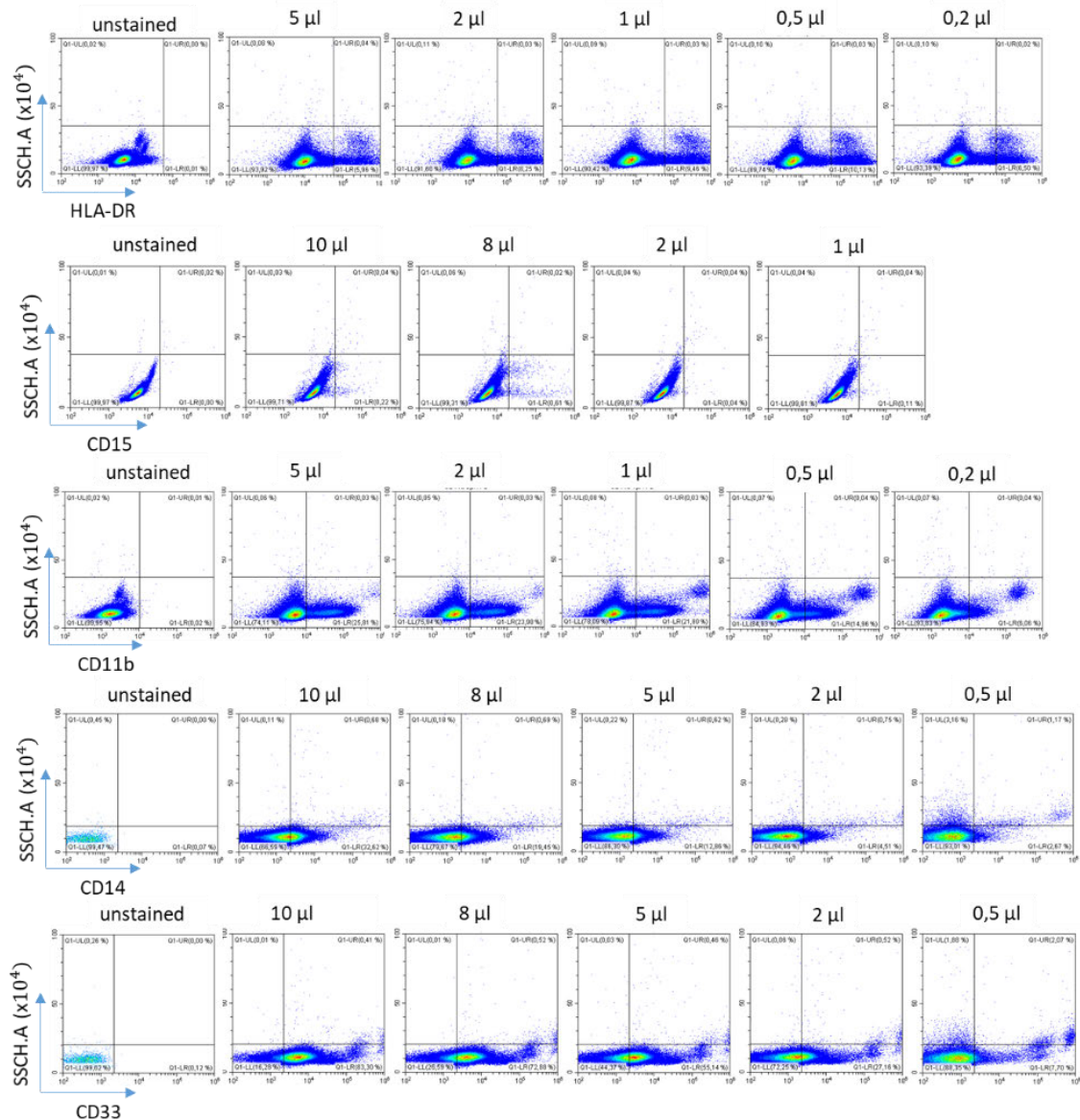
Für Antikörper mit Paratopen gegen MDSCs wurden die folgende Ergebnisse erhalten. Für den Antikörper gegen HLA-DR kann festgestellt werden, dass sich die negative von der positiven Population in jeder Konzentration gut abtrennt. In der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,2  $\mu$ l ist die positive jedoch näher an der negativen Population detektiert als bei den vorangegangenen Volumina.

Für CD15 ist eine gute Abtrennung bei 10  $\mu$ l und 8  $\mu$ l zu sehen, während bei 2  $\mu$ l und 1  $\mu$ l kaum eine klare Grenze zu ziehen ist.

Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ l des CD11b Antikörpers lässt sich eine gute Abtrennung erkennen. Bei niedrigeren Konzentrationen verschmelzen positive und negative Population hingegen sehr stark.

Bei CD14 ist eine starke Verschiebung der negativen Population innerhalb der verschiedenen Konzentrationen zu erkennen und lag so zum Teil im positiven Bereich. Erst bei einem Volumen von 0,5  $\mu$ l kann die negative Population, im Vergleich mit der ungefärbten Kontrolle, klar im negativen Bereich erkannt werden.

Eine solche starke Verschiebung lässt sich ebenfalls innerhalb des Antikörpers gegen CD33 detektieren. Auch hier wird erst bei der niedrigsten Konzentration von 0,5  $\mu$ l eine klare Zuordnung sichtbar.



### Abbildung 5: MDSC Antikörper Titration

Ergebnisse der Einzelfärbungen von Beads mit Antikörpern für die MDSC-Detektion in verschiedenen Konzentrationen. Vorranggegangenes Gating der Granulozyten mittels SSC.H gegen FSC.H nicht gezeigt (siehe Abb. 16, Anhang)

Quelle: eigene Darstellung

Ebenso wie mit den Antikörpern gegen MDSCs wurde mit Antikörpern gegen T-Zellen verfahren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 (Anhang) dargestellt.

Für CCR6 lässt sich bei der niedrigsten Konzentration von 2 µl keine klare positive Population erkennen. Bei 10 µl und 8 µl ist die negative Population leicht in der positiven zu erkennen. Dies ist bei 5 µl nicht mehr der Fall.

Die Populationen des Antikörpers gegen CXCR3 zeigen sich für 10, 8 und 5 µl ähnlich. Negative und positive Population gehen leicht ineinander über, eine Abgrenzung ist



dennoch möglich. Bei 2  $\mu\text{l}$  schwimmt die positive Population zu stark mit der negativen.

Bei CD4 ist sehr deutliche eine Verschiebung der negativen Kontrolle von rechts nach links bis 0,2  $\mu\text{l}$  zu erkennen. Die positive Kontrolle grenzt sich dabei klar ab.

Auch für CD45RA ist eine Verlagerung der Populationen bis 2  $\mu\text{l}$  zu erkennen. Jedoch ist bei 2  $\mu\text{l}$  die rechtsliegende Population immer noch nicht hinter der zuvor gesetzten Grenze für die Negativkontrolle.

Der Antikörper gegen ICOS verhält sich bei 10 und 8  $\mu\text{l}$  ähnlich, es ist keine Negativpopulation auszumachen. Danach bewegt sich diese nach links. Jedoch liegt auch bei 2  $\mu\text{l}$  eine Population über der gesetzten Grenze. Für alle Konzentrationen sind zwei Populationen sichtbar, außer bei 3  $\mu\text{l}$  hier ist nur eine zu erkennen.

Bei CD25 ist eine schwache Verschiebung der Populationen zu sehen. Bei 5  $\mu\text{l}$  lässt sich klar eine negative Population abgrenzen. Für 2  $\mu\text{l}$  ist eine Trennung möglich, jedoch schwimmt hier die positive mit der negativen Kontrolle leicht.

Ein stärkeres shiften der Populationen ist bei CRTH2 erkennbar. Bis zu einer Konzentration von 5  $\mu\text{l}$  ist keine Population klar hinter der negativ Kontroll Grenze. Bei 2  $\mu\text{l}$  ist sie schließlich hinter der Grenze.

Für den Antikörper gegen CD127 sind bei 5  $\mu\text{l}$  keine zwei Populationen sichtbar, bei den darauffolgenden Konzentrationen sind zwei erkennbar. Jedoch ist auch hier eine leichte Verschmelzung der Populationen bei 0,2 und 0,1  $\mu\text{l}$  zu sehen. Bei 0,5  $\mu\text{l}$  ist eine klare Abgrenzung möglich.

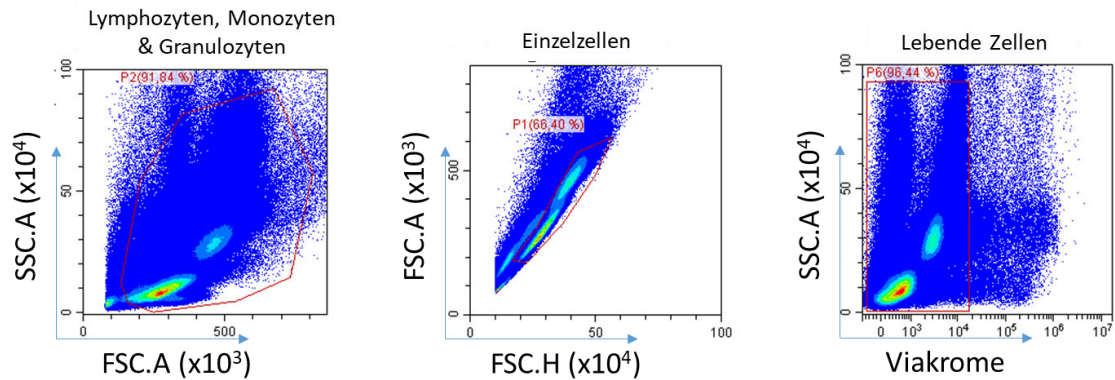
Bei CCR4 ähneln sich die Volumina stark. Es ist keine klare positive Population zu sehen. Selbst bei der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 5  $\mu\text{l}$  sind keine zwei Populationen sichtbar.

Zum Schluss zeigt sich bei dem Antikörper gegen CD45 bei 10, 8 und 2  $\mu\text{l}$  eine große Population auf der linken Seite. Bei 1  $\mu\text{l}$  ist eine Trennung in zwei Populationen sichtbar, dabei ist jedoch die rechts liegende noch nicht vollständig in der Grenze der ungefärbten Kontrolle.

## 5.2 Überprüfung der Kompensation

Nach Abschließen der Kompensation, wurde eine Blutprobe mit den zuvor bestimmten Antikörperkonzentrationen als Mastermix und der richtigen Kompensationseinstellung

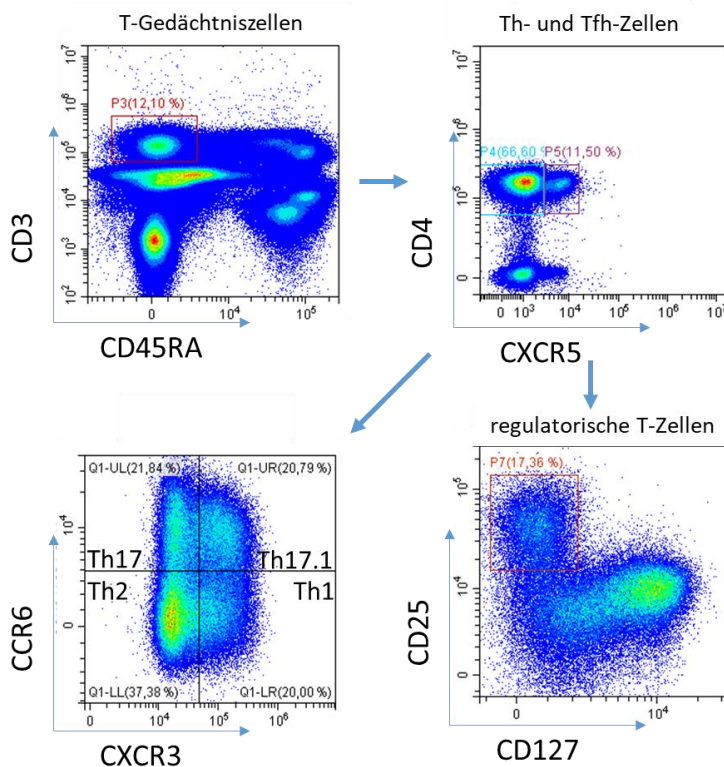
analysiert. Dabei konnte ein gutes Ergebnis erzielt werden. Wie in Abbildung 6 zu sehen, konnten zu Beginn Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten erkannt und gated werden. Daraufhin ließ sich die Population an Einzelzellen ebenfalls gut erfassen. Darüber hinaus ließen sich lebende von toten Zellen abgrenzen.



**Abbildung 6: Gating von Immunzellen sowie anschließendes Gating der Einzelzellen und lebenden Zellen aus einer Psoriasis Blutprobe.**

Quelle: eigene Darstellung

Innerhalb der lebenden Zellen wurde anschließend CD3 gegen CD45RA, wie in Abbildung 7 dargestellt, im Pseudo Color Plot dargestellt und CD3<sup>+</sup> und CD45RA<sup>-</sup> gated, welche sich gut als Population erkennen ließen. Daraus konnten verschiedene Populationen von T-Helferzellen differenziert werden, durch auftragen von CCR6 gegen CXCR3 im Diagramm. Dabei ist eine klare Auftrennung in vier Populationen zu sehen. Auch die Trennung von regulatorischen T-Zellen, welche CD25<sup>+</sup> und CD127<sup>-</sup> sind, war gut erkennbar. Dafür wurden zuvor CD4<sup>+</sup> und CXCR5<sup>-</sup> Zellen gated. Aus CXCR5<sup>+</sup> Zellen, den folliculären T-Zellen, lässt sich ebenfalls die Trennung in vier Populationen realisieren, ist hier jedoch nicht mit aufgeführt.



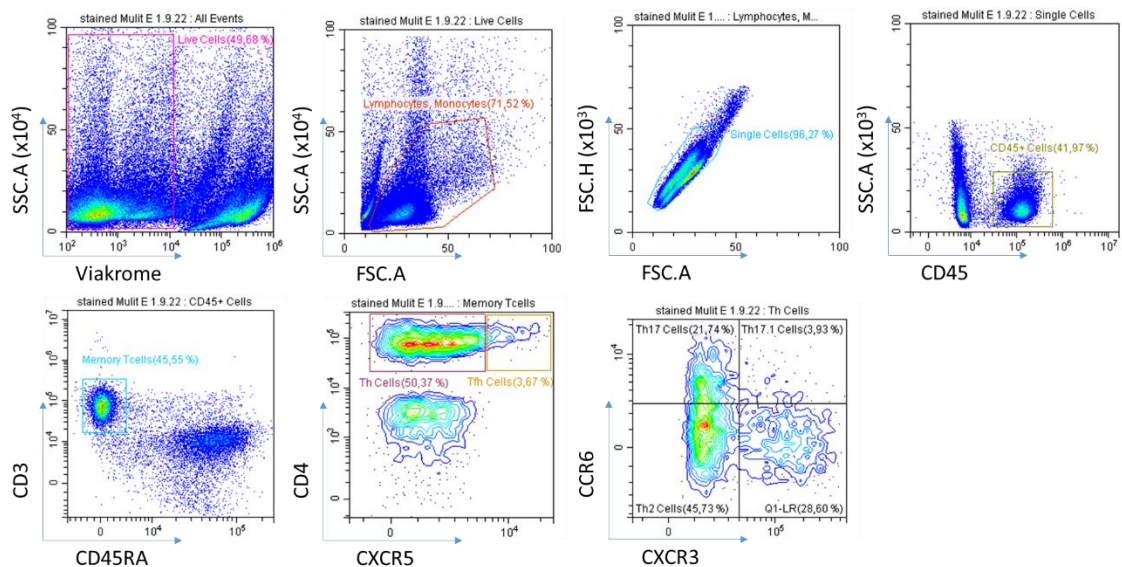
**Abbildung 7: Gating von Tregs und T-Helferzellen Subpopulationen aus einer Psoriasis Blutprobe.**  
 Immunzellen, Einzelzellen und Lebendzell Gating im Voraus nicht gezeigt (Vgl. Abb. 6)  
 Quelle: eigene Darstellung

### 5.3 Octodissociator Programme für die Leukozyten-Isolation aus Gewebeproben

Neben Blutproben sollten ebenso Gewebeproben der betroffenen Hautstellen auf T-Zellen und MDSCs hin untersucht werden. Für die Isolierung der Zellen wurde mit dem Miltenyi Octodissociator gearbeitet und drei Programme getestet. Der Octodissociator ist ein Instrument für die automatisierte und standardisierte Gewebezersetzung und Homogenisierung (Miltenyi Biotec, 2022). Um die Programme miteinander zu vergleichen, wurden die Antikörper gefärbten Zellen nach ihrer Trennbarkeit der T-Helferzellen betrachtet.

Eine Gewebeprobe wurde, nachdem sie wie zuvor beschrieben zerkleinert wurde, mit den Enzymen für 30 min bei 1628 rpr im Octodissociator inkubiert. In Abbildung 8 sind die daraus resultierenden Cytoflex Ergebnisse aufgezeigt. Immunzellen, Lebende Zellen sowie Einzelzellen ließen sich klar identifizieren. Anschließend ist eine gute Abtrennung der CD45 positiven Zellen zu sehen. Innerhalb dieser Zellpopulation wurde anschließend die Differenzierung von CD3<sup>+</sup> und CD45RA<sup>-</sup>, auch T-Gedächtniszellen (Memory

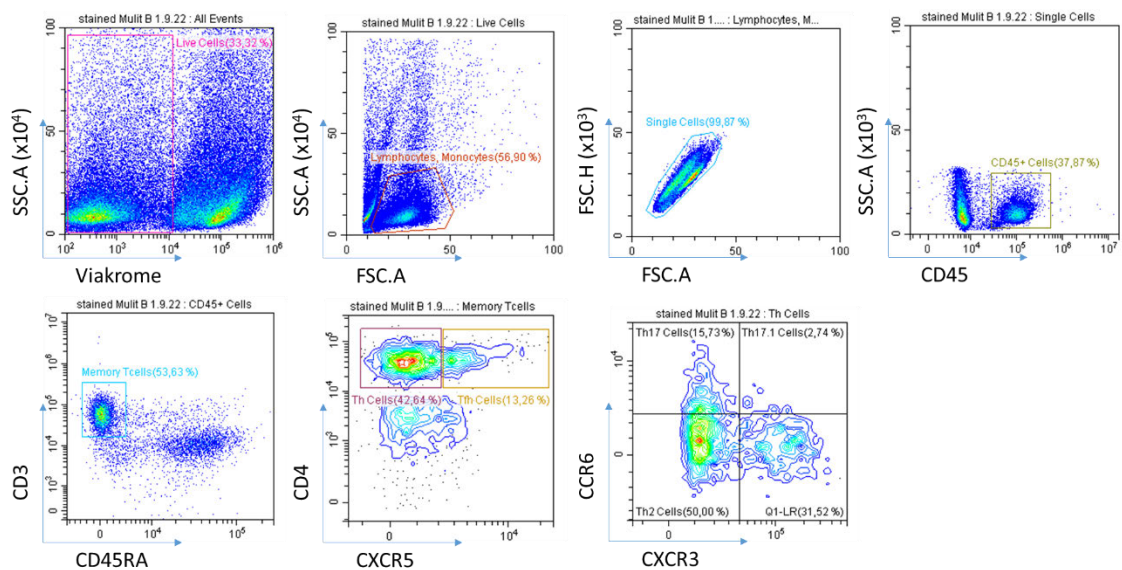
T-cells), überprüft. Auch hier lässt sich die Population gut erkennen und eingrenzen. T-Helferzellen und folliculäre T-Helferzellen, bei Auftragung von CD4 gegen CXCR5 im Diagramm, lassen sich ungenauer abgrenzen. Beide Zelltypen sind CD4<sup>+</sup> Zellen, dies ist im Plot gut erkennbar, jedoch ist die Grenze zwischen den CXCR5<sup>-</sup> Th-Zellen und den CXCR5<sup>+</sup> Tfh-Zellen fließend. Eine Abgrenzung ist jedoch immer noch möglich. Abschließend wurden aus den Th-Zellen Th17-, Th17.1- und Th2-zellen überprüft. Dabei lässt sich die Population in rechten unteren Quadranten gut von den Restlichen abgrenzen. Th17.1-Zellen sind nur sehr wenig vorhanden mit 3,9 %, die Abgrenzung, vor allem zu den CXCR3<sup>+</sup> Zellen, ist dabei trotzdem gegeben. Die Th17- und Th2-Zellen befinden sich klar im CXCR3 negativem Bereich, auch sind positiv für CCR6 Th17-Zellen und negativ für CCR6 Zellen, auch Th2-Zellen, zu erkennen. Die Grenze zwischen beiden Populationen schwimmt lediglich leicht. Durch die gute Trennbarkeit der Th17.1-Zellen können jedoch auch die zwei zuvor genannten Populationen geeignet voneinander abgegrenzt werden.



**Abbildung 8: Zellisolation mit dem Octodissociator für 30 min und 1628 rpr**  
Quelle: eigene Darstellung

Das zweite Programm lief eine Stunde mit 1998 rpr. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 zusehen. Auch hier können alle Immunzellen, Lebende Zellen und Einzelzellen deutlich erfasst werden. Auffallend ist jedoch der geringere Anteil an lebenden Zellen, so sinkt der Anteil von 50 % auf nur noch 33 %. CD45<sup>+</sup> Zellen sind gut als Population erkennbar,

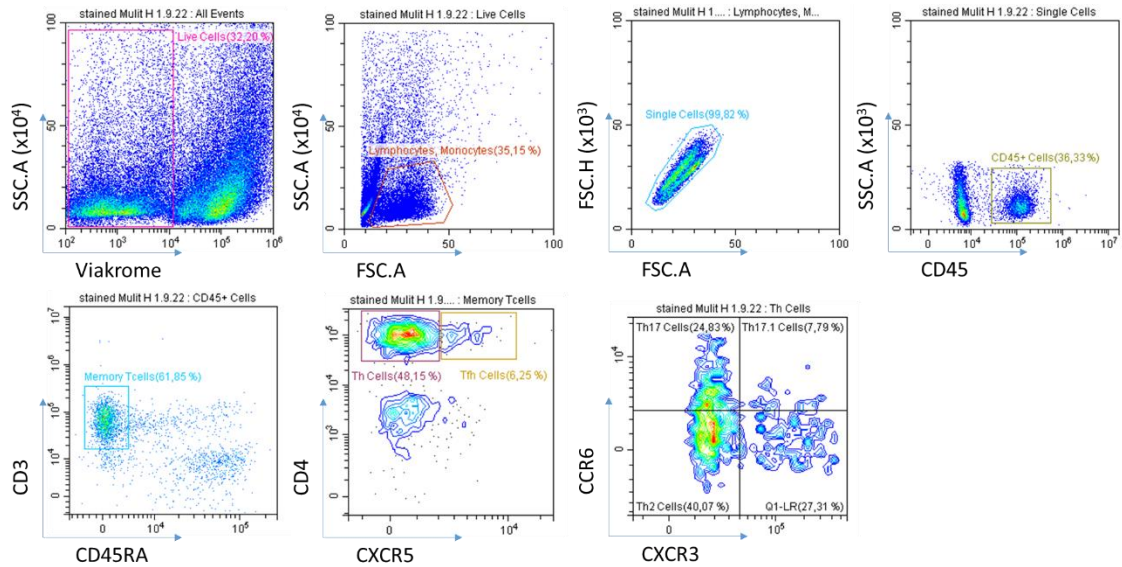
jedoch ist der Anteil geringer mit 37,9 % im Vergleich zu 42 % innerhalb des 30 Minuten Programms. T-Gedächtniszellen lassen sich trotz dessen gut erkennen. Ebenso die Abtrennung der Th-Zellen von Tfh-Zellen. Dabei zeigt sich der Anteil der Tfh-Zellen ebenso größer als bei dem zuvor genannten Programm. Bei 1 Stunde sind es 13,3 %, bei 30 Minuten nur rund 4 %. Für das letzte Gating der T-Zell Subpopulationen lässt sich eine gute Abtrennung der CXCR3 positiven von den negativen erkennen, jedoch ist kaum eine einzelne CCR6<sup>+</sup> Population zu sehen. Auch Th17.1 Zellen sind kaum vorhanden.



**Abbildung 9: Zellisolation mit dem Octodissociator für 1h und 1998 rpr**  
Quelle: eigene Darstellung

Als drittes wurde die Isolation aus Gewebe bei 2332 rpr für eine Stunde und 30 Minuten durchgeführt. Lebende Zellen, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten und Einzelzellen können auch hier gut identifiziert werden. Der Lebend Zell Anteil ist dabei zum vorherigen Programm fast gleich mit 32 %. CD45<sup>+</sup> zeigen sich ähnlich zum vorherigen Programm mit einem nur leicht geringeren Anteil von 36,3 %. Ebenso die T-Gedächtniszellen mit 51,9 % zu 53,6 % zum Programm mit einer Stunde. Die daraus isolierten Th-Zellen sind als Population gut sichtbar, jedoch ist die Tfh-Population nicht klar abgrenzbar und sehr gering mit 6,3 %. Bei den Subpopulationen der Th-Zellen sind CXCR3<sup>-</sup> Zellen zu erkennen, jedoch lässt sich keine Unterscheidung in CCR6 positive und negative Zellen schließen. Zudem verschiebt sich die Population leicht in den

CXCR3<sup>+</sup> Bereich. Eine Th17.1 Population lässt sich nicht klar abgrenzen. Nachzuvollziehen sind diese Ergebnisse in Abbildung 10.



**Abbildung 10: Zellisolation mit dem Octodissociator für 1h 30 min und 2332 rpr**

Quelle: eigene Darstellung

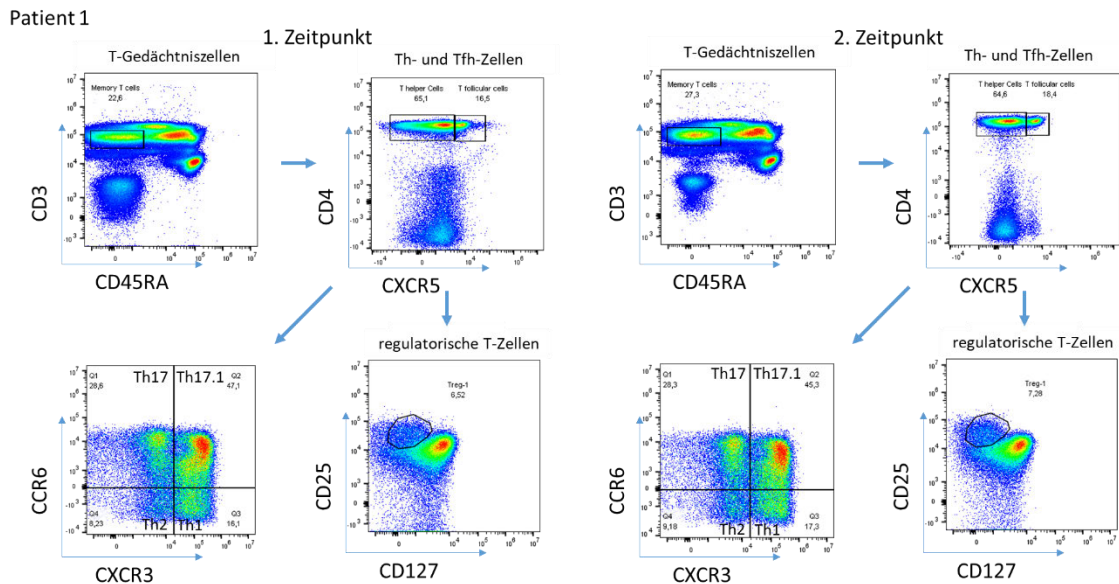
## 5.4 Blut- und Gewebeanalyse von Psoriasis vulgaris Patienten

Durch die zuvor durchgeführte Antikörpertitration und Kompensation für die Untersuchung der Immunzellen in Blut- und Gewebeproben sowie die Überprüfung dreier Programme für die optimale Zellisolation aus Gewebeproben, konnten die folgenden Ergebnisse bei Psoriasis vulgaris Patienten erlangt werden.

### 5.4.2 Ergebnisse der T-Zell Analyse

Die T-Zell Analyse bei Patient 1 aus den Blutproben hat die in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse geliefert. T-Gedächtniszellen lassen sich gut isolieren, dabei ist eine Erhöhung zu beobachten von 22,6 % zum 1. Zeitpunkt und 27,3 % zum zweiten. Die Tfh-Zellpopulation liegt sehr nah an der Th-Population, lässt sich jedoch noch abgrenzen. Der Anteil der zwei Populationen ist zu beiden Zeitpunkten sehr ähnlich. Die größere Th-Zellpopulation zeigt sich mit 65,1 % zu 64,6 % und die Tfh-Population mit 16,5 % zu 18,4 %. Eine Auftrennung der Th-Subpopulationen ist einfach durchführbar, ebenso die Trennung der regulatorischen T-Zellen. Th17, Th1 und Th2 Zellen zeigen kaum eine

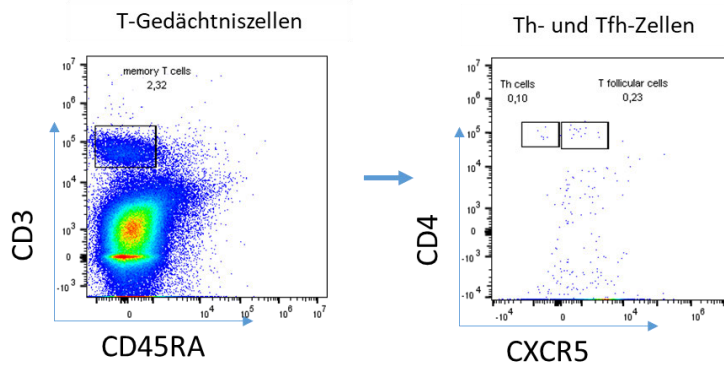
Veränderung in Ihrer Anzahl. Die größte Population ist hier die der Th17.1-Zellen mit rund 45 %, danach folgen Th17-Zellen mit 28 %. Die kleinste Population stellen Th2-Zellen dar.



**Abbildung 11: T-Zell Gating bei Patient 1 zum 1. und 2. Zeitpunkt aus Blutproben**

Quelle: eigene Darstellung

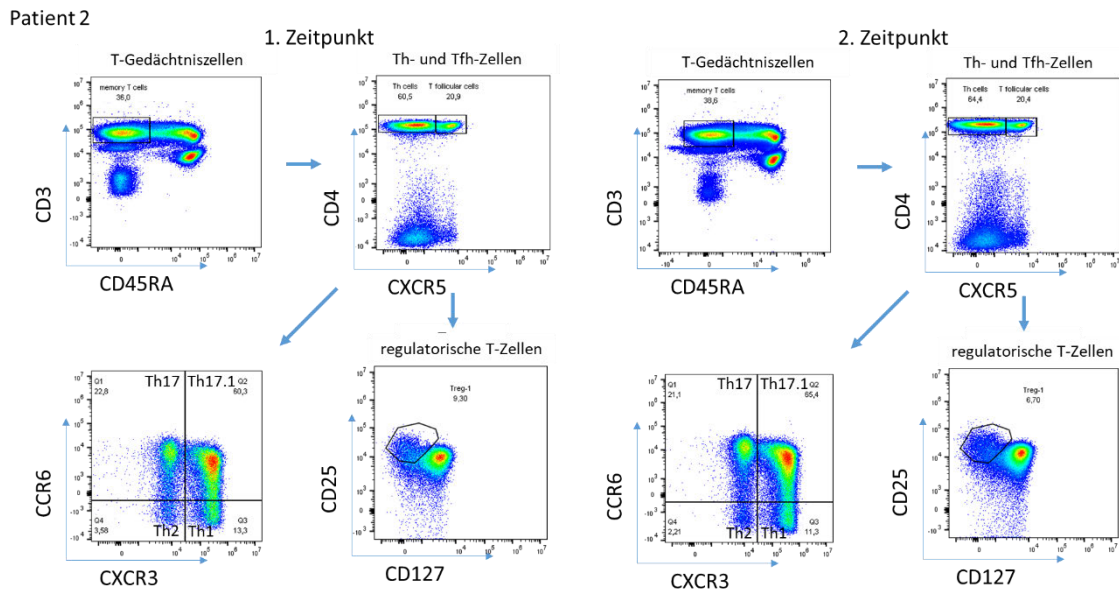
Patient 1 wurde am ersten Tag ebenfalls eine Gewebeprobe entnommen und auf die Immunzellen hin untersucht. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse dargestellt. Es konnten T-Gedächtniszellen identifiziert werden, jedoch war deren Anteil sehr gering mit rund 2 %. Das anschließende Isolieren der Th- und Tfh-Populationen konnte kaum realisiert werden, aufgrund der niedrigen Anzahl von 0,1 und 0,2 %. Weiteres Gating war nicht möglich.



**Abbildung 12: T-Zell Gating bei Patient 1 zum 1. und 2. Zeitpunkt aus einer Gewebeprobe**  
 Quelle: eigene Darstellung

Für Patient 2 wurde ebenfalls das Auftreten von T-Zell Populationen begutachtet. Die Cytotflex Ergebnisse sind in Abbildung 13 nachzuvollziehen. T-Gedächtniszellen können isoliert werden und zeigen sich mit einem höheren Anteil mit 36 % zu 38,6 % im Vergleich mit Patient 1. Ebenfalls lässt sich die Population der folliculären T-Helferzellen etwas besser von den T-Helferzellen trennen, dabei ist hier auch die Tfh-Population kleiner. Der Anteil der Th-Zellen vergrößert sich zum 2. Zeitpunkt auf 64,4 % zu vorherigen 60,5 %. Tfh-Zellen bleiben recht konstant auf rund 20 %. Bei beiden Proben können die vier Th-Subpopulationen klar isoliert werden, genauso die regulatorischen T-Zellen. Ebenso wie bei Patient 1 ist die Th17.1-Population die größte und die Th2-Population die kleinste.





**Abbildung 13: T-Zell Gating bei Patient 2 zum 1. und 2. Zeitpunkt aus Blutproben**

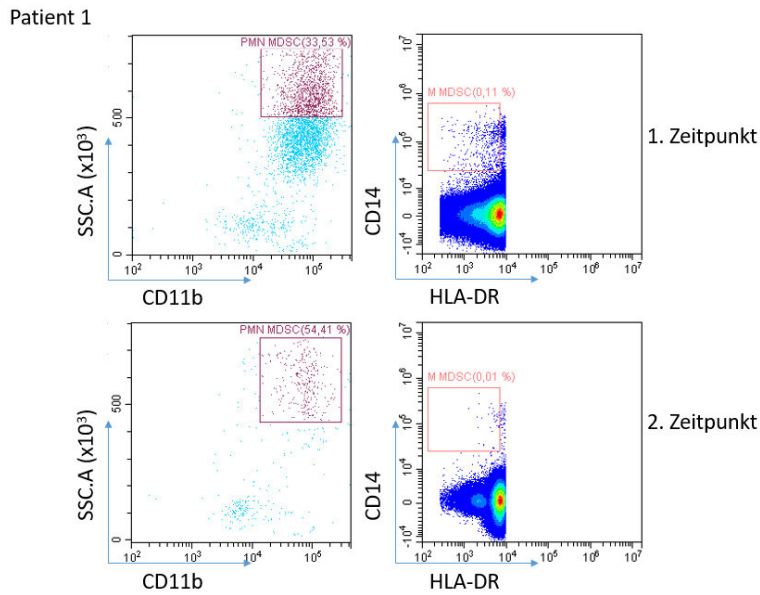
Quelle: eigene Darstellung

#### 5.4.2 Ergebnisse der MDSC-Analyse

Die Ergebnisse des MDSC Gatings sind in Abbildung 14 und 15 in Pseudo Color Plots dargestellt. Das Gating der MDSCs aus HLA-DR negativen und  $CD15^+$  und  $CD14^+$  Zellen, nur für die PMN-MDSCs, ist in Abbildung 19 und 20 im Anhang nachzuvollziehen. Dem Gating der MDSCs ging, wie in Kapitel 4.5.2, das Auswählen der Granulozyten, der Einzelzellen und lebenden Zellen voraus, ist jedoch in den Abbildungen ausgespart.

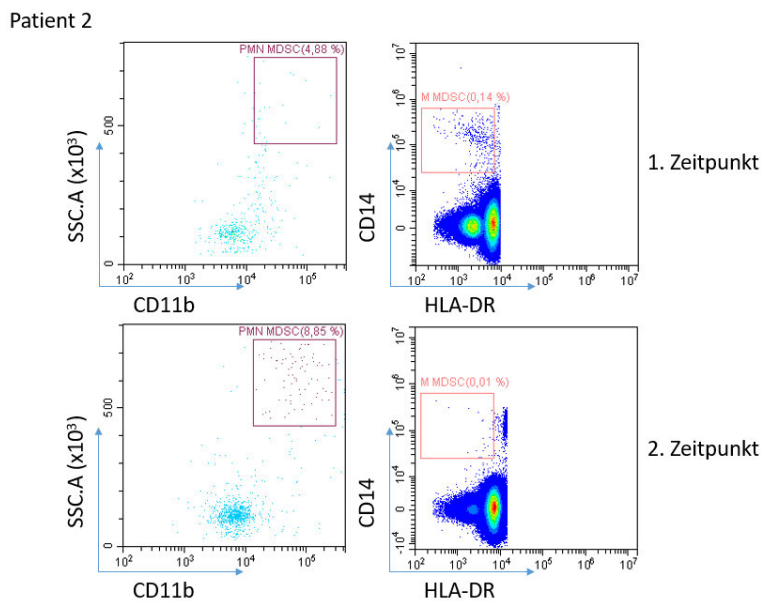
Beginnend bei den PMN-MDSCs lässt eine Steigerung dieser, vom ersten zum zweiten Blutabnahme Zeitpunkt, in allen Fällen erkennen. So steigt die Zahl bei Patient 1 von 33,53 % auf 54,41 % PMN-MDSCs. Bei Patient 2 lässt sich ein geringerer Anteil zu Beginn von 4,88 % feststellen. Ein Anstieg, zu 8,85%, zum 2. Zeitpunkt fand jedoch ebenso statt.

Als zweites wurden die M-MDSCs betrachtet. Hier ist eine gegenteilige Entwicklung, im Vergleich mit den PMN-MDSCs, zu erkennen. So sinkt der Anteil dieser bei Patient 1 von 0,11 % auf 0,01 % zum 2. Zeitpunkt. Auch bei Patient 2 ist eine Abnahme von 0,14 % zu 0,01% zu verzeichnen.



**Abbildung 14: MDSCs bei Blutabnahme am 1. und 2. Zeitpunkt von Patient 1**

Quelle: eigene Darstellung



**Abbildung 15: MDSCs bei Blutabnahme am 1. und 2. Zeitpunkt von Patient 2**

Quelle: eigene Darstellung

Für die genauere Betrachtung des Anteils der MDSCs an allen lebenden Zellen ist es sinnvoll zusätzlich den Anteil der HLA-DR und CD15/CD14 Zellen, in Abbildung 19 und 20, einzubeziehen. Durch Multiplikation der Prozente lassen sich die Anteile von PMN- und M-MDSCs bestimmen. Diese sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Anteile der PMN- und M-MDSCs von Patient 1 und 2 an allen lebenden Zellen.**

	Patient 1		Patient 2	
	1. Zeitpunkt	2. Zeitpunkt	1. Zeitpunkt	2. Zeitpunkt
PMN-MDSCs	0,160 %	0,058 %	0,007 %	0,017 %
M-MDSCc	0,062 %	0,006 %	0,110 %	0,007 %

Quelle: eigene Darstellung

Es lässt sich eine Bestätigung der vorherigen Ergebnisse für Patient 2 feststellen. Der Anteil der PMN-MDSCs steigt und der der M-MDSCs sinkt. Im Gegensatz lässt sich bei Patient 1 jedoch feststellen, dass sich im Hinblick aller Zellen der Anteil der PMN-MDSCs zum 2. Zeitpunkt hin erniedrigt. M-MDSCs werden, ebenso wie bei Patient 2 und wie in den vorherigen Ergebnissen gezeigt, weniger.

## **6 Diskussion**

Im nachfolgenden Kapitel gilt es zu klären welche Antikörperkonzentrationen für die Analyse von T-Zellen und MDSCs bei Blut- und Gewebeproben von Psoriasis vulgaris Patienten für die Durchflusszytometrie optimal sind. Ebenso soll aus den drei verschiedenen getesteten Programmen für die Zellisolation aus Gewebeproben die beste ausgewählt werden. Abschließend werden erste Proben von Patienten untersucht.

### **6.1 Ein Antikörper Panel für die Überprüfung von T-Zellen und MDSCs mittels Durchflusszytometrie**

Bei der Arbeit mit Durchflusszytometrie ist es wichtig, bevor mit Patientenproben gearbeitet werden kann, die richtigen Antikörper für die zu analysierenden Zellen zu finden und diese schließlich in der korrekten Konzentration einzusetzen. Die Auswahl der Antikörper resultierte aus vorrausgegangenen Berichten über vorhandene Marker auf T-Zellen und MDSCs (Neri, et al., 2021; Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2020; Bronte, et al., 2016). Für diese Arbeit wurden alle Antikörper titriert, um ihre optimalen Einsatz Volumina zu finden. Die Titration ist wichtig, um hohe Auflösungen und hohe Expressionslevel zu erhalten und so Populationen klar voneinander abgrenzen zu können. Dabei kann zudem Geld gespart werden, da die angegebenen Konzentrationen der Hersteller oft zu hoch für den eigentlichen Einsatz sind (UWCCC Flow Cytometry Laboratory, 2016). Zu hohe Konzentrationen können indes unspezifische Bindungen hervorrufen, wodurch die Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle zu stark sein kann, jedoch soll sie gleichzeitig so gering wie möglich gehalten werden (Hulspas, 2010). In Kapitel 5.1 wurden die Ergebnisse der Titrationen dargelegt. Für den Antikörper gegen HLA-DR kann sich dabei für eine Konzentration von 0,5  $\mu$ l entschieden werden. Zwar ließen sich die Populationen auch in höherer Konzentration gut abtrennen, jedoch kann sich aus dem Aspekt des Antikörper Einsparens für das geringere Volumen entschieden werden. Ähnliches gilt für CD15, hier soll sich zwischen 10 und 8  $\mu$ l festgelegt werden. Auch hier wird die niedrigere Konzentration von 8  $\mu$ l für weitere Analysen gewählt. Die Populationen von CD11b konnten ausschließlich bei 1  $\mu$ l gut getrennt wahrgenommen werden, weshalb eben dieses Volumen gewählt wird. Für CD14 wurde eine Verschiebung der negativen Population festgestellt, welche erst bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ l des

Antikörpers stoppte. Aus diesem Grund wird 0,5  $\mu$ l als optimale Konzentration angenommen. Für den letzten Antikörper für MDSCs gegen CD33 ließ sich gleiches wie bei CD14 erkennen. Für weitere Analysen wird sich schlussendlich für 0,5  $\mu$ l entschieden, da auch hier die Negativkontrolle erst dort klar zugeordnet werden konnte.

Neben Antikörpern gegen MDSCs wurden ebenso Antikörper gegen T-Zellen titriert. Dabei kann sich bei dem Antikörper CCR6 für 5  $\mu$ l für die weiteren Analysen entschieden werden, da sich bei geringerer Konzentration keine klar positive und bei 10 und 8  $\mu$ l keine klar negative Population abzugrenzen ist. Für CXCR3 ließ sich ein verschwimmen der Populationen erst ab 2  $\mu$ l feststellen, daher können 5  $\mu$ l genutzt werden. Der Antikörper gegen CD4 wird 0,2  $\mu$ l festgelegt, da sich die Populationen vorher zu stark verschieben und erst bei 0,2  $\mu$ l die negative Population klar in der zuvor gesetzten Grenze liegt. Auch bei CD45RA war eine Verschiebung sichtbar, welche bis zum zuletzt getesteten Volumen von 2  $\mu$ l noch nicht vollständig zum Stillstand kam. Eine Überprüfung mit einer niedrigeren Konzentration von 1  $\mu$ l und niedriger wäre anzuraten, um zu prüfen wo die Verschiebung stoppt. So wurde in einer Studie eine optimale Konzentration von 0,15  $\mu$ l, bei gleichem Endvolumen, angenommen, welche wesentlich niedriger ist als die hier getesteten (Chattopadhyay, Yu, & Roederer, 2007). Für Analysen innerhalb dieser Arbeit wird sich an diesem Punkt jedoch für 2  $\mu$ l entschieden. Ähnlich verhält es sich mit ICOS, hier war auch ein shiften zu erkennen, welches scheinbar bei 2  $\mu$ l nicht vollständig abgeschlossen war. Hier werden trotz dessen vorerst 2  $\mu$ l festgelegt. Auffällig ist hier außerdem die fehlende zweite Population bei 3  $\mu$ l, im Gegensatz zu den anderen Konzentrationen. Denkbar ist dabei ein Pipettierfehler, wobei zu wenig Antikörper zu den Beads gegeben wurde oder das Vergessen der positiven Beads welche die Antikörper binden können. Eine klare Entscheidung lässt sich hingegen bei CD25 treffen. Bei 5  $\mu$ l verschoben sich die Populationen nicht mehr und verschmolzen auch nicht, weshalb mit 5  $\mu$ l weitergearbeitet wird. Für CRTH2 wird 2  $\mu$ l festgelegt, da erst hier eine klare Zuordnung möglich war und keine Verschiebung mehr stattfand. Die Populationen bei dem Antikörper gegen CD127 ließen sich zu Beginn nicht unterscheiden und wurden erst bei niedrigeren Konzentrationen getrennt. Dabei verschmolzen sie jedoch wieder bei zu niedrigen Volumina ab 0,2  $\mu$ l, aus diesem Grund wird mit 0,5  $\mu$ l weitergearbeitet da an diesem Punkt eine gute Trennung möglich ist. Bei CCR4 ähnelten sich die verschiedenen Volumina stark. Es war keine klare zweite Population erkennbar. Die Auftrennung in eine

negative und eine positive Population müsste jedoch stattfinden, so konnten in Studien, welche ebenfalls CCR4 nutzen, eine Trennung bei ungefähr  $10^2$  registriert werden. Die negative Population war demzufolge darunter und die positive darüber zu verzeichnen (Zhang, et al., 2010). Eventuell war bei den durchgeführten Konzentrationen die korrekte nicht dabei, demzufolge wären weitere Titrationsschritte mit höheren oder niedrigeren Konzentrationen sinnvoll. Denkbar wäre zudem, dass der Antikörper selbst defekt ist, entweder durch fehlerhafte Produktion des Herstellers, aber auch durch eventuelle falsche Lagerung im Labor oder zu häufiges Auftauen und Einfrieren, was die Antikörper in ihrer Funktionalität beeinträchtigen kann (dianova, 2022). Daher wäre eine Wiederholung der Titration mit einem neuen Antikörper ebenfalls förderlich. Für erste Analysen wird mit  $0,5 \mu\text{l}$  gearbeitet. Der letzte titrierte Antikörper gegen CD45 zeigt erst bei  $1 \mu\text{l}$  eine Auftrennung in zwei Populationen, zuvor ist nur eine große zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass die getesteten Konzentrationen zu hoch angesetzt waren. Da erst bei  $1 \mu\text{l}$  eine Trennung zusehen ist, die negative Population aber noch nicht die Grenze der ungefärbten Probe überschreitet, wären weitere Titrationsschritte sinnvoll. Für diese Arbeit wird jedoch mit  $1 \mu\text{l}$  weitergearbeitet, da eine Trennung der Populationen möglich ist.

Alle ausgewählten Volumina, welche sich aus der Titration der einzelnen Antikörper ergaben, sind zusammengefasst in Tabelle 4 (Anhang) nachzulesen.

Mit den zuvor genannten Antikörperkonzentrationen wurde eine Kompensation durchgeführt. Dabei sind die in Kapitel 5.2 gezeigten Ergebnisse erhalten worden. Es ließ sich eine gute Abtrennung der Populationen erkennen. Für die kommenden Patientenproben wurde deshalb mit dieser Kompensation in den Experimenten gearbeitet. Diese wurde so auch für die Überprüfung der Zellisoliationsprogramme aus Gewebe genutzt.

## **6.2 Erprobung der Leukozytenisolation aus Gewebeproben**

Drei Programme wurden für die Isolation aus Gewebeproben getestet, dabei unterschieden sich die Programme in ansteigender Dauer und rpr Zahl. Die Vorbereitung der Proben und die genutzten Enzyme und deren Konzentration waren gleich. Die verwendete Kollagenase IV ist indes nötig für die Spaltung des Kollagens im Gewebe und die DNase verhindert Viskosität, welche durch tote oder beschädigte Zellen auftreten

kann und zu einem erschwerten Ernten der isolierten Zellen führen kann (Sigma-Aldrich, 2006). Bei allen Programmen konnten lebende Zellen, Mono- und Lymphozyten sowie Einzelzellen klar identifiziert werden. Zuerst fällt der sinkende Anteil der lebenden Zellen auf. Bei 30 Minuten Inkubation ist dieser bei fast 50 %, bei 1 Stunde sowie 1 Stunde und 30 Minuten sinkt der Anteil auf jeweils knapp über 30 %. Dies bedeutet, dass bei längerer Inkubation wesentlich mehr Zellen absterben, dies könnte aus der Zerstörung von Oberflächenproteinen resultieren, welche zur Beschädigung der Zellen und ihrem schließlichem Absterben führen könnte. Bei längerer Inkubation wäre eine Reduktion der Enzymkonzentration denkbar, um mehr lebende Zellen zu erhalten (Feng, et al., 2018). Die CD45<sup>+</sup> Population war ebenso bei allen sichtbar, jedoch mit 42 % bei der kürzesten Inkubation von 30 min am höchsten. Die Differenzierung zwischen CXCR5 positiven und negativen Zellen konnte bei Programm 2 am besten realisiert werden. Der Anteil der Tfh-Zellen war mit 13 % am höchsten, bei 30 Minuten hingegen war der Anteil sehr gering. Eventuell war die Inkubationszeit für die Trennung der CXCR5-Populationen mit 30 Minuten zu kurz. Da dort jedoch die meisten Zellen überlebten, wäre vielleicht eine längere Inkubationszeit, aber nicht über einer Stunde, denkbar, also eine Mischung aus Programm 1 und 2, um viele lebende Zellen zu erhalten und gleichzeitig CXCR5 positive von negativen Zellen besser trennen zu können. Die Betrachtung der Th-Subpopulationen ergab, dass im Vergleich der Programme, jenes mit 30 Minuten die beste Trennung zuließ. Hier war allerdings die Th- Population am größten, wodurch mehr Zellen vorhanden waren und somit auf die bessere Trennung schließen lassen. Zudem konnte bei allen drei Programmen keine bzw. nur kaum eine Th1.17 Population ausgemacht werden. Eine Möglichkeit wäre, dass sich Th-Zellen lediglich bei Akne inversa nicht oder nur kaum in Th17.1-Zellen differenzieren. Für die Psoriasis hingegen ist ein Anstieg dieser Population zu erwarten (Tsiogkas, Mavropoulos, Dardiotis, Zafiriou, & Bogdanos, 2022). Dies wird auch mit der Psoriasis Probe für die Überprüfung der Kompensation in der Abbildung 7 in Kapitel 5.2 bestätigt, da Th17.1 detektiert wurden. Für die Analyse der ersten Gewebeprobe eines Psoriasis Patienten wird vorerst das 30 Minuten Programm gewählt, da hier die meisten lebenden Zellen vorlagen und eine Trennung der Populationen größtenteils möglich war. Das Testen weiterer Programme wäre jedoch als sinnvoll zu betrachten sowie die Erprobung mit Psoriasis Gewebe.

### 6.3 T-Zell Vorkommen bei Psoriasis Patienten

Die T-Zell Untersuchung aus den Blutproben der beiden Patienten ergab eine klare Abtrennung aller isolierten Populationen. Somit kann die Etablierung der Antikörper Panels als erfolgreich angesehen werden, da das Ziel der klaren Isolierung der verschiedenen Zelltypen erreicht wurde. Die Anteile der Populationen sind in beiden Patienten sehr ähnlich, vor allem die Th-Subpopulationen zeigen eine ähnliche Verteilung auf. So ist bei beiden die größte Population, die der Th17.1-Zellen. Eine erhöhte Anzahl dieser Zellen im Vergleich mit gesunden Personen konnte bereits früher festgestellt werden. Ebenso die Th17-Zellen, sie konnten als erhöht wahrgenommen werden und zeigten zudem eine geringere Anzahl im Gegensatz zu den Th17.1-Zellen (Tsiogkas, Mavropoulos, Dardiotis, Zafiriou, & Bogdanos, 2022). Dies war hier ebenfalls der Fall, die zweit größte Population stellte die der Th17-Zellen dar. Früher wurde die Psoriasis als eine nur von Th1-Zellen gesteuerte Krankheit charakterisiert, in neueren Studien wurden jedoch auch Th17-Population identifiziert und deren Beteiligung innerhalb der Psoriasis, sowie weiteren Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen, erfasst (Cai, Fleming, & Yan, 2012). Diese Entdeckung kann in dieser Arbeit bestätigt werden, da, wie zuvor beschrieben, bei den Patienten ebenfalls ein großer Anteil von Th17- und Th17.1-Zellen gefunden wurde. Es konnten auch Th1-Populationen isoliert werden, welche sich jedoch in einem geringeren Ausmaß zeigten. Dies spricht dafür das Th17-Zellen für die Entwicklung der Krankheit eine große Rolle spielen.

Eine Veränderung der Zellpopulationen unter Therapie wurde kaum erkannt, es gab größtenteils nur leichte Schwankungen unter 1 %. Eventuell finden größere Veränderungen erst im späteren Verlauf der Therapie statt. Ebenso könnte die verabreichte Anthralinkonzentration zu gering gewesen sein. Möglich wäre, dass erst ab einer bestimmten Menge an Anthralin eine Veränderung der Populationsanteile sichtbar wird.

Bei der anschließenden Analyse der Gewebeprobe von Patient 1 konnte zwar eine klare Abtrennung der T-Gedächtniszellen erkannt werden, jedoch war der Anteil sehr gering. Sie sollte allerdings zu finden sein, da im Gewebe diese Zellen für eine lange Zeit vorkommen und dort die adaptive Immunantwort erhalten. Der Anteil der Th- und Tfh-Zellen war entsprechend der T-Gedächtniszellen sehr niedrig, es wurden kaum Zellen detektiert, obwohl auch hier diese Populationen im Gewebe zu finden sein sollten (Vu,



Koguchi-Yoshioka, & Watanabe, 2021). Daraus konnten keine Subpopulationen isoliert werden. Daher kann festgestellt werden, dass die Isolation der Immunzellen aus Psoriasis Gewebe noch nicht korrekt funktioniert und, wie bereits im vorherigen Kapitel erklärt, weitere Programme ausgetestet werden sollten. Die Untersuchung des Gewebes zum 2. Zeitpunkt wird deshalb nicht durchgeführt. Neben weiteren Inkubationszeiten könnte zum Beispiel eine Varianz der Enzymkonzentrationen getestet werden, um ausschließen zu können, dass die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen nicht optimal für die Isolierung der Zellen waren. Als Alternative oder Kontrolle könnte auch eine Immunhistologie durchgeführt werden. Dabei erfolgt der Nachweis der Zellen mittels Mikroskopie. Dafür könnten die Zellen ebenso mit Antikörpern gefärbt und deren Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden (Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, 2009).

#### **6.4 MDSC Vorkommen bei Psoriasis Patienten**

Zwei Blutproben von Psoriasis Patienten wurden untersucht. Es konnte eine Verminderung der M-MDSC Population bei beiden Patienten vom 1. auf den 2. Zeitpunkt festgestellt werden. Für die PMN-MDSCs wurde eine geringere Population bei Patient 1 zum 2. Zeitpunkt im Vergleich mit dem 1. festgestellt. Bei Patient 2 hingegen stieg der Anteil der Population. Wie in Kapitel 1.3 erklärt, findet zuerst eine Verschlimmerung der Entzündung bei der Psoriasis Behandlung mit Anthralin statt bevor sich der Zustand verbessert. In einer sich anschließenden Studie soll geklärt werden, ob MDSCs in die Haut rekrutiert werden. Eine Studie zu MDSCs in Psoriasis betroffenen Patienten konnte einen Anstieg dieser, im Vergleich mit gesunden Probanden, detektieren (Chen, et al., 2020). Zum jetzigen Zeitpunkt wurde jedoch die Art der MDSCs nicht charakterisiert und ob diese sich unter Therapie mit Anthralin verändern. Durch die erhaltenen Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die rekrutierten MDSCs möglicherweise zur Gruppe der PMN-MDSCs gehören und nicht der M-MDSCs, da diese zwar vorhanden aber nicht zunehmen. Somit könnte sich die zunehmende Anzahl der PMN-MDSCs bei Patient 2 erklären. Nach Beginn der Therapie könnte diese Rekrutierung stattfinden und deshalb zum 2. Zeitpunkt mehr PMN-MDSCs aufzeigen. Patient 1 hingegen zeigte eine gegenteilige Entwicklung. Der Unterschied liegt dabei, dass zum 1. Zeitpunkt bereits eine Dosis Anthralin verabreicht wurde, bevor wir die Möglichkeit hatten, die Patientenprobe

zu rekrutieren. Es könnte bedeuten, dass bereits PMN-MDSCs entwickelt wurden. Dies würde sich auch im Anteil der PMN-MDSCs von Patient 1 zu Patient 2 bestätigen, da bei ersterem der Anteil wesentlich höher ist. Jedoch verringert sich danach der Anteil. Eventuell erfolgt ein rascher Anstieg der PMN-MDSCs, welche danach aber wieder sinken und sich auf ein bestimmtes Level einpegeln. Diese Vermutung lässt sich jedoch mit nur 2 Patientenproben und zwei Zeitpunkten nicht konkret bestätigen. Die Patienten sollten daher länger behandelt werden. Zudem wäre eine Erhöhung des Anthralins eine Möglichkeit die Rekrutierung der MDSCs besser nachvollziehen zu können.

In der aufbauenden Studie sollen 30 Patienten untersucht werden. Dabei ist das Ziel eine klare Aussage über die Infiltration der MDSCs unter Therapie machen zu können.

### **6.5 T-Zellhemmung durch MDSCs**

Mit Hilfe des etablierten Antikörper Panels konnte das Vorkommen von MDSCs bei Psoriasis untersucht werden. M-MDSCs ähneln dabei stark den Monozyten und PMN-MDSCs den neutrophilen Granulozyten, da sie jeweils aus den gleichen Vorläuferzellen entstehen. Dadurch besteht eine Wahrscheinlichkeit, dass die MDSCs, welche in den untersuchten Patientenproben charakterisiert wurden, eben diese nicht sind, sondern ihre morphologischen Verwandten Zelltypen, also Monozyten und Neutrophile. Somit ist es essenziell wichtig die Zelltypen noch genauer zu charakterisieren. Goldstandard ist dabei ein funktionaler Test, einen sogenannten Suppressionstest der isolierten MDSCs durchzuführen. Da MDSCs im Gegensatz zu Neutrophilen bzw. Monozyten in der Lage sind T-Zellen zu inhibieren, wird bei einem solchen Test ihre Fähigkeit einer Suppression von T-Zellen überprüft. Realisierbar wäre dies mit Hilfe einer CFSE (Carboxyfluoresceinsuccinimidylester)-Färbung (Bronte, et al., 2016). CFSE ist eine effektive Methode, um Lymphozyten Teilung zu beobachten. CFSE bindet intrazelluläre Moleküle, dabei halbiert sich bei jeder Teilung die Anzahl der markierten Moleküle. Die daraus resultierende abnehmende Fluoreszenzintensität kann mit der Durchflusszytometrie gemessen werden (Quah & Parish, 2010). Würden nun T-Zellen mit supprimierenden MDSCs inkubiert, könnte die kaum stattfindende Teilung der T-Zellen durch das CFSE detektiert werden, mit Monozyten oder Neutrophilen würde keine Veränderung sichtbar sein. In weiteren Studien wurde die Immunsuppressive Wirkung und damit die Hemmung der T-Zellen hauptsächlich den PMN-MDSCs zugeschrieben

(Aarts & Kuijpers, 2018). Da bei der Untersuchung der zwei Patienten vor allem das Auftreten von PMN-MDSCs zu beobachten war, wäre es denkbar, dass eine solche T-Zell Hemmung festzustellen sein sollte. In dieser Arbeit wurde keine CFSE-Färbung durchgeführt, wäre jedoch sowohl mit M-MDSCs als auch mit PMN-MDSCs eine sinnvolle Ergänzung. Allerdings könnte ein Anhaltspunkt für die korrekte Isolierung von MDSCs die Veränderung der Th17-Population sein. Th17-Zellen wurden bereits als wichtige regulatorische Instanz bei Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen beschrieben. Dabei steht der Rückgang dieser mit der Reduktion der Krankheiten in Zusammenhang (Singh, et al., 2014). Bei den untersuchten Patienten konnte eine leichte Abnahme der Th17-Population beobachtet werden. In Verbindung mit den detektierten MDSCs kann die Vermutung aufgestellt werden, dass diese MDSCs eventuell die zuvor beschriebene supprimierende Wirkung auf T-Zellen besitzen, da diese weniger werden. Somit wäre bestätigt, dass diese Zellen MDSCs sind und keine Monozyten oder Neutrophilen sind. Da sich die Abnahme aber nur im Rahmen von 2 % liegt, kann diese Vermutung nicht vollständig angenommen werden. Eine Analyse der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt unter Therapie und eine Begutachtung der Entwicklung der Plaques wäre notwendig.

## **7 Ausblick**

Es konnte erfolgreich ein Antikörper Panel für die Untersuchung von Psoriasis Patienten erstellt werden. Dieses Panel kann im Verlauf weiterer Forschungen helfen die Erkrankung genauer zu verstehen und somit auch zu besseren und effektiveren Behandlungsmöglichkeiten führen. In einer anschließenden Studie soll dabei die Therapie mit Anthralin im Vordergrund stehen und herausgefunden werden, ob Anthralin die Rekrutierung von MDSCs in die Haut veranlasst und diese wiederum die T-Zellen hemmen. Die Analyse der Zellen aus Blutproben hat sehr gut funktioniert und wird auf die in die hier beschriebene Art weitergeführt. Für die Untersuchung von Gewebeproben bedarf es jedoch weitere Erprobung der Immunzellisolation mit verschiedenen Inkubationszeiten und Enzymkonzentrationen. Gewebeproben sind ebenso wichtig um die Menge der vorkommenden T-Zellen und MDSCs, am direkten Ort der Entzündung zu betrachten.

In dieser Bachelorarbeit wurden, nach der Etablierung des Panels, Psoriasis Patienten untersucht und dabei auch das Auftreten von MDSCs untersucht. Dabei unterscheiden sich MDSCs in PMN- und M-MDSCs. In früheren Studien wurden Immunsuppressive Wirkungen von MDSCs erkannt. Um zu überprüfen, ob die isolierten MDSCs eben jene sind, wäre es möglich die T-Zell Proliferation in Anwesenheit der Zellen mit Hilfe einer CFSE-Markierung zu untersuchen, wie in Kapitel 6.5 bereits erwähnt. Für die Unterscheidung wäre eine CFSE-Markierung parallel zur Untersuchung der MDSCs bei Psoriasis Patienten als notwendig zu erachten.

In früheren Studien wurde zudem die Segregation verschiedener Zytokine, wie IFN- $\gamma$  und Interleukin-12 (IL-12) oder IL-17 bei Entstehung der Psoriasis detektiert (Cai, Fleming, & Yan, 2012). Interessant wäre hierbei, ob sich die Zytokin Expression, beispielsweise in der Menge oder in der Art der Zytokine, unter Behandlung der Krankheit verändert. Mit Hilfe der Durchführung einer quantitativen PCR (qPCR) könnte die Expression analysiert werden. Wie bereits zuvor erwähnt sollen in einer weiteren Studie MDSCs unter Anthralin-Therapie beobachtet werden. Insbesondere würde die Expressionsanalyse mittels qPCR von Vorteil sein, um den genauen Ablauf der Rekrutierung dieser Zellen nachzuvollziehen. Es wurde bereits definiert, dass die Ansammlung dieser innerhalb von zwei Schritten erfolgt. Dabei spielen Zytokine eine

entscheidende Rolle. Die Zytokine IL-6 und GM-CSF, welche durch Keratinozyten segregiert werden, und weitere Faktoren, treiben im ersten Schritt die Entwicklung der MDSCs voran. Der zweite Schritt, die Aktivierung der MDSCs, erfolgt ebenfalls durch Zytokine, aber auch durch Hochregulation von Arginase I und Stickstoffmonoxid (Condamine & Gabrilovich, 2011). Ob dies genauso in Psoriasis Patienten unter Therapie abläuft, würde sich durch eine qPCR bestätigen lassen können oder ebenso widerlegen.

.

## **8 Zusammenfassung**

In dieser Bachelorarbeit war das Hauptziel die Etablierung eines Antikörper Panels für T-Zellen und MDSCs für die Analyse von Leukozyten in Psoriasis vulgaris Blut- und Gewebeproben. Psoriasis ist eine chronische Entzündungserkrankung der Haut und betrifft rund 2-3 % der Bevölkerung weltweit. Die Untersuchung der verschiedenen Zelltypen erfolgte dabei mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Im ersten Teil dieser Arbeit mussten dafür die Antikörper mit Beads titriert werden, um deren optimale Einsatzkonzentration zu finden und mögliche falsche Ergebnisse in späteren Probenanalysen ausschließen zu können. Es wurde für jeden Antikörper eine Konzentration ausgewählt, jedoch gab es bei einigen keine Eindeutigen Ergebnisse, wie bei CCR4 und CD45RA, für die weitere Titrationsschritte nötig wären. Im Anschluss wurde erfolgreich eine Kompensation mit diesen Antikörpern durchgeführt. Nach Etablierung des Antikörperpanels wurden Blut- und Gewebeproben zweier Psoriasis betroffenen Patienten auf T-Zellen und MDSCs vor und unter Therapie betrachtet. Die Therapie erfolgte mit Anthralin, dessen Wirkung noch nicht vollständig geklärt ist. Für die Gewebeprobenanalyse wurden zuvor drei Varianten für die Isolation der Immunzellen aus Gewebe ausgetestet. Dabei unterschieden sich die Varianten in der Inkubationszeit mit DNase und Kollagenase. Die Überprüfung innerhalb einer Patientenprobe mit der ausgewählten Variante war jedoch nicht erfolgreich. Um die Zelltypen aus Blutproben betrachten zu können, wurden PBMCs aus dem Blut isoliert und die Zellen anschließend mit den Antikörpern gefärbt. Bei beiden Patienten zeigte sich die Th17.1-Population als größte und die Th2-Population als kleinste. Dass die Psoriasis eine Th17 dominierte Krankheit ist, konnte damit bestätigt werden. Es gab kaum Veränderungen innerhalb der Subpopulationen zum 2. Zeitpunkt. Für die MDSCs zeigte sich eine größere PMN-MDSC Population. Dies könnte zeigen, dass die während einer Anthralinbehandlung rekrutierten MDSCs, der Gruppe der PMN-MDSCs angehören. Jedoch ähneln sich diese in ihrer Morphologie mit denen der Neutrophilen, weshalb die Überprüfung der T-Zell Suppression, welche nur durch die MDSCs gegeben ist, mittels CFSE-Färbung angeschlossen werden sollte. An diese Bachelorarbeit schließt sich eine weitere Studie an, welche sich näher mit der Wirkungsweise der Anthralinbehandlung bei Psoriasis und der damit verbundenen MDSCs beschäftigen wird.

## **9 Summary**

In this bachelor thesis, the main objective was to establish an antibody panel for T cells and MDSCs for the analysis of leukocytes in psoriasis vulgaris blood and tissue samples. Psoriasis is a chronic inflammatory disease of the skin and affects about 2-3% of the population worldwide. The investigation of the different cell types was carried out using flow cytometry. In the first part of this work, the antibodies had to be titrated with beads for this purpose, to find their optimal application concentration and to be able to exclude possible false results in later sample analyses. A concentration was selected for each antibody, but for some, there were no unambiguous results, such as for CCR4 and CD45RA, for which further titration steps would be necessary. Subsequently, compensation with these antibodies was successfully performed. After the establishment of the antibody panel, blood and tissue samples from two psoriasis-affected patients were analyzed for T cells and MDSCs before and under therapy. Therapy was with anthralin, the effect of which has not yet been fully elucidated. For tissue sample analysis, three variants for the isolation of immune cells from tissue were previously tested out. The variants differed in the incubation time with DNase and collagenase. However, testing within a patient sample with the selected variant was not successful. To view the cell types from blood samples, PBMCs were isolated from the blood and the cells were subsequently stained with the antibodies. In both patients, the Th17.1 population was shown to be the largest and the Th2 population the smallest. That psoriasis is a Th17-dominated disease was thus confirmed. There was little change within the subpopulations at time 2. For the MDSCs, a larger PMN-MDSC population was shown. This might show that the MDSCs recruited during anthralin treatment, belong to the PMN-MDSC group. However, their morphology is similar to that of neutrophils, so the verification of T-cell suppression, which is only given by MDSCs, should be connected by CFSE staining. This bachelor thesis will be followed by a further study, which will deal in more detail with the mode of action of anthralin treatment in psoriasis and the associated MDSCs.

**Literaturverzeichnis**

- Aarts, C., & Kuijpers, T. (2018). neutrophils as myeloid-derived suppressor cells. *European Journal of Clinical Investigation*.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 163-176.
- Ayala-Fontánez, N., Soler, D., & McCormick, T. (2016). Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. *Psoriasis: Targets and Therapy*, 7-32.
- Benezeder, T., Painsi, C., Patra, V., Dey, S., Holcman, M., Lange-Asschenfeldt, B., . . . Wolf, P. (2020). Dithranol targets keratinocytes, their crosstalk with neutrophils and inhibits the IL-36 inflammatory loop in psoriasis. *Elife*.
- Bio-rad 1. (01. 11. 2022). *Flow Cytometry - Doublet Discrimination*. Von <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-doublet-discrimination.html> abgerufen
- Bio-rad 2. (13. 08. 2022). *Flow Cytometry - Fluorescence Compensation*. Von <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-fluorescence-compensation.html> abgerufen
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M., Frey, A., Greten, T., . . . Gaborilovich, D. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*.
- Cai, Y., Fleming, C., & Yan, J. (2012). New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cellular & Molecular Immunology*, 302-309.
- Chattopadhyay, P., Yu, J., & Roederer, M. (2007). Application of Quantum Dots to Multicolor Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology*, vol 374. In M. Bruchez, & C. Hotz, *Quantum Dots* (S. 175-184). Humana Press.
- Chen, C., Tan, L., Zhu, W., Lei, L., Kuang, Y., Liu, P., . . . Peng, C. (2020). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells Is a Novel Strategy for Anti-Psoriasis Therapy. *Mediators of Inflammation*, 2020.
- Condamine, T., & Gaborilovich, D. (2011). Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends in Immunology*, 19-25.
- dianova. (9. 11. 2022). *Lagerungshinweise für Antikörper und Proteine*. Von <https://www.dianova.com/faq/faq-lagerungshinweise-fuer-antikoerper-und-proteine/> abgerufen



- Feng, X., Liu, L., Yu, B.-Q., Huang, J.-M., Gu, L.-D., & Xu, D.-F. (2018). Effect of optimized collagenase digestion on isolated and cultured nucleus pulposus cells in degenerated intervertebral discs. *Medicine (Baltimore)*.
- Goda, K., & Szalóki, G. (2015). Compensation in multicolor flow. *Cytometry Part A*, *S*, 982-985.
- Groth, C., Hu, X., Weber, R., Fleming, V., Altevogt, P., Utikal, J., & Umansky, V. (2019). Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *British Journal of Cancer*, *120*(1), 16-25.
- Holstein, J., Fehrenbacher, B., Brück, J., Müller-Hermelink, E., Schäfer, I., Carevic, M., . . . Eberle, F. (2017). Anthralin modulates the expression pattern of cytokeratins and antimicrobial peptides by psoriatic keratinocytes. *Journal of Dermatological Science*, *3*, 236-245.
- Holstein, J., Solimani, F., Baum, C., Meier, K., Pollmann, R., Didona, D., . . . Hertl, M. (2020). Immunophenotyping in pemphigus reveals a TH17/TFH17 cell–dominated immune response promoting desmoglein1/3-specific autoantibody production. *Translational and Clinical Immunology*, *147*(6), 2358-2369.
- Hulspas, R. (2010). Titration of Fluorochrome-Conjugated Antibodies for Labeling Cell Surface Markers on Live Cells. *Current Protocols of Cytometry*, 6-29.
- Hulspas, R., O'Gorman, M., Wood, B., Grataman, J., & Sutherland, D. (2009). Considerations for the Control of Background Fluorescence in Clinical Flow Cytometry. *Cytometry Part B*, *S*, 355-364.
- Kumar, B., Connors, T., & Farber, D. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, *48*(2), 202-213.
- Löffler, G. (2008). *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie* (Bd. 7. Auflage). Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Lowes, M., Bowcock, A., & Krueger, J. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *NATURE*, 866-873.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2009). *Der Experimentator: Immunologie*. Springer-Verlag.
- miltenyi biotec. (11. 11. 2022). *Blood*. Von <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/resources/macs-handbook/human-cells-and-organs/human-cell-sources/blood-human.html?countryRedirected=1#gref> abgerufen
- Miltenyi Biotec. (9. 11. 2022). *gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters*. Von <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/gentlemacs-octo-dissociator-with-heaters.html#gref> abgerufen

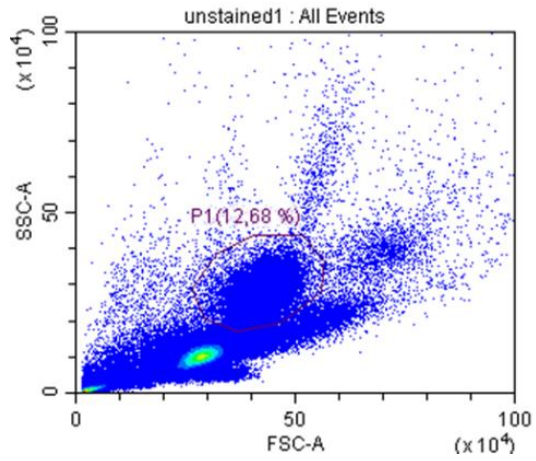
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie* (9. Auflage Ausg.). Berlin: Springer Spektrum.
- Neri, D., Carevic-Neri, M., Brück, J., Holstein, J., Schäfer, I., Soliman, F., . . . Ghoreschi, K. (2021). *Arginase 1+ IL - 10 + polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells are elevated in patients with active pemphigus and correlate with an increased Th2/Th1 response*. *Experimental Dermatology - Wiley*.
- Ostrand-Rosenberg, S., & Sinha, P. (2020). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *The Journal of Immunology*, 4499-4506.
- Quah, B., & Parish, C. (2010). The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *Journal of Visualized Experiments*(44), 2259.
- Ryding, S. (07. 11. 2022). *What are T-Cells?* Von Medical News: <https://www.news-medical.net/health/What-are-T-Cells.aspx> abgerufen
- Sigma-Aldrich (Hrsg.). (2006). *Enzymes for Cell and Dissociation and Lysis*. *Biofiles*(Issue 2).
- Singh, R., Hasan, S., Sharma, S., Nagra, S., Yamaguchi, D., Wong, D., . . . Hossain, A. (2014). Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 13(12), 1174-1181.
- Tsiogkas, S., Mavropoulos, A., Dardiotis, E., Zafiriou, E., & Bogdanos, D. (2022). A sharp decrease of Th17, CXCR3+-Th17, and Th17.1 in peripheral blood is associated with an early anti-IL-17-mediated clinical remission in psoriasis. *Clinical & Experimental Immunology*, 210(1), 79-89.
- University of Iowa. (08. 11. 2022). *Flow Cytometry - Eliminating Dead Cells from Analysis*. Von <https://medicine.uiowa.edu/flowcytometry/protocolssample-prep/sample-preparation-analysis/eliminating-dead-cells-analysis> abgerufen
- UWCCC Flow Cytometry Laboratory. (25. 10. 2016). *Titrating Antibodies for Flow Cytometry*. Von [https://cancer.wisc.edu/research/wp-content/uploads/2017/03/Flow\\_TechNotes\\_Antibody-Titrations\\_20170918.pdf](https://cancer.wisc.edu/research/wp-content/uploads/2017/03/Flow_TechNotes_Antibody-Titrations_20170918.pdf) abgerufen
- Veglia, F., Perego, M., & Gabrilovich, D. (2017). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*, 19, 108-119.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., . . . Wichers, H. (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health*. Cham: Springer.
- Vide, J., & Magina, S. (2017). Moderate to severe psoriasis treatment challenges through the era of biological drugs. *An Bras Dermatol*, 668-674.

- Vu, T., Koguchi-Yoshioka, H., & Watanabe, R. (2021). Skin-Resident Memory T Cells: Pathogenesis and Implication for the Treatment of Psoriasis. *Journal of Clinical Medicine*, *10*(17), 3822.
- Zhang, H., Song, K., Rabin, R., Hill, B., Perfetto, S., Roederer, M., . . . Farber, J. (2010). CCR2 Identifies a Stable Population of Human Effector Memory CD4+ T Cells Equipped for Rapid Recall Response. *The Journal of immunology*, *185*(11), 6646-6663.
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, *45*(2), 27-37.

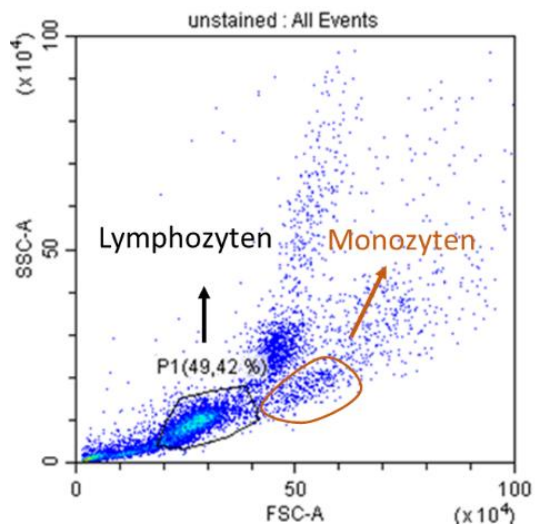
**Anhang****Tabelle 3: Ausgewählte Antigene und zugehörige exprimierende Zelltypen**

<b>Antigen</b>	<b>exprimierende Zellen</b>
<b>HLA-DR (human leukocyte antigen)</b>	<b>aktivierte T-Zellen</b>
<b>CD3</b>	<b>T-Zellen</b>
<b>CD15</b>	<b>Neutrophile, Eosinophile, Monozyten</b>
<b>CD45</b>	<b>hämatopoetische Zellen</b>
<b>CD11b</b>	<b>T-, B-, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen</b>
<b>CXCR5 (auch: CD185)</b>	<b>B-Zellen</b>
<b>CCR4 (auch: CD194)</b>	<b>Th2-, Treg-, Th17-Zellen, CD8-T-Zellen, Monozyten, B-Zellen</b>
<b>CXCR3 (auch: CD183)</b>	<b>B-Zellen, T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen</b>
<b>CD25</b>	<b>Lymphozyten</b>
<b>CRTH2 (auch: CD294)</b>	<b>Th2-Zellen, Basophile, Eosinophile</b>
<b>CD4</b>	<b>T-Zellen, Monozyten, Makrophagen</b>
<b>CD14</b>	<b>myelomonozytische Zellen, Granulozyten</b>
<b>CD33</b>	<b>myeloide Vorläuferzellen, Monozyten, Granulozyten</b>
<b>CCR6 (auch: CD196)</b>	<b>T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen</b>
<b>CD127</b>	<b>Vorläuferzellen im Knochenmark, T-Zellen, B-Zellen</b>
<b>ICOS (auch: CD278)</b>	<b>aktivierte T-Zellen</b>
<b>CD45RA</b>	<b>naive T-Zellen, wenige auch auf T-Gedächtniszellen</b>

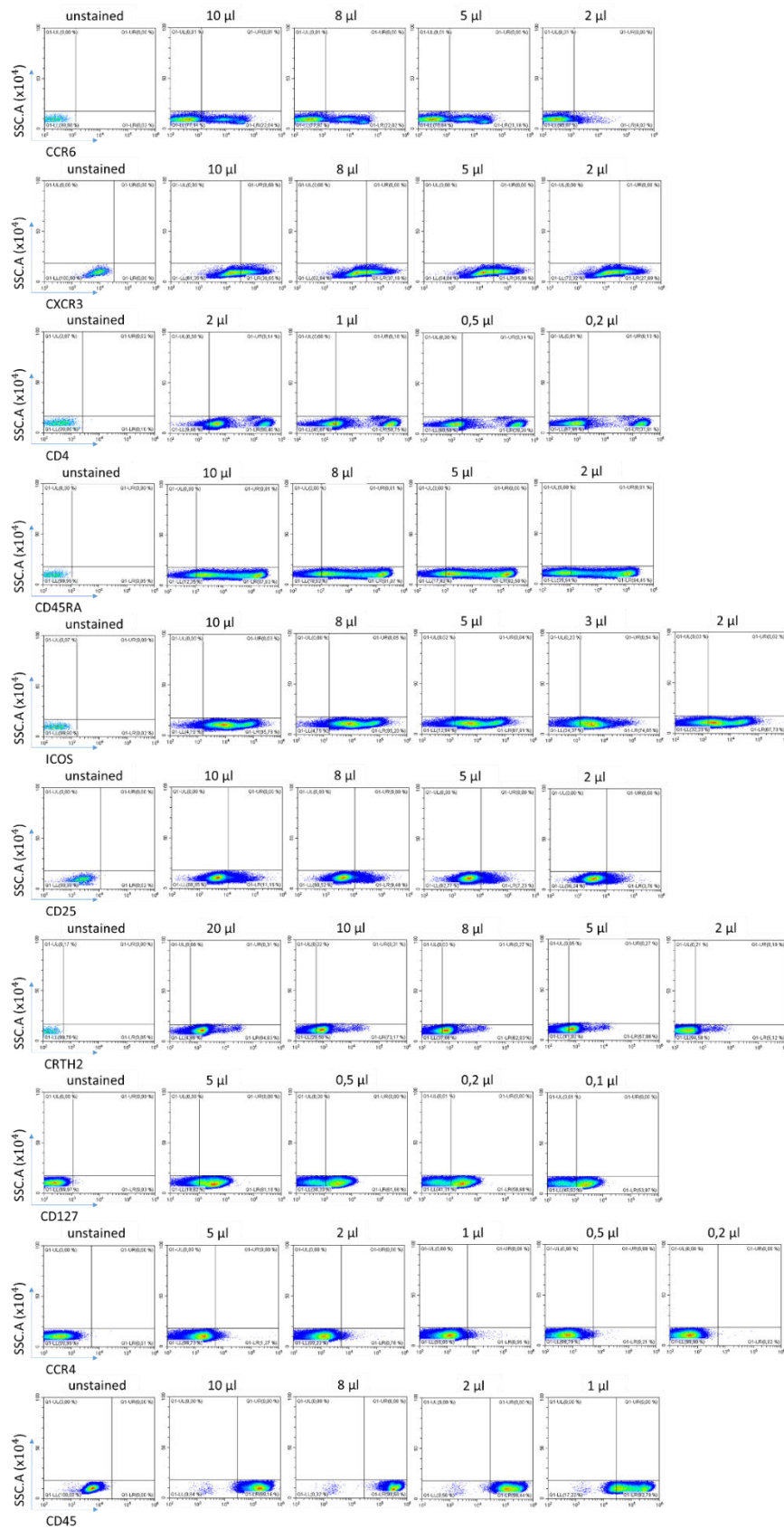
Quelle: Luttmann, Bratke, Küpper, & Myrtek, 2009; Murphy & Weaver, 2018



**Abbildung 16: Gating von Granulozyten**  
Quelle: eigene Darstellung



**Abbildung 17: Gating von Lymphozyten und Monozyten**  
Quelle: eigene Darstellung



**Abbildung 18: T-Zell Antikörper Titration.**

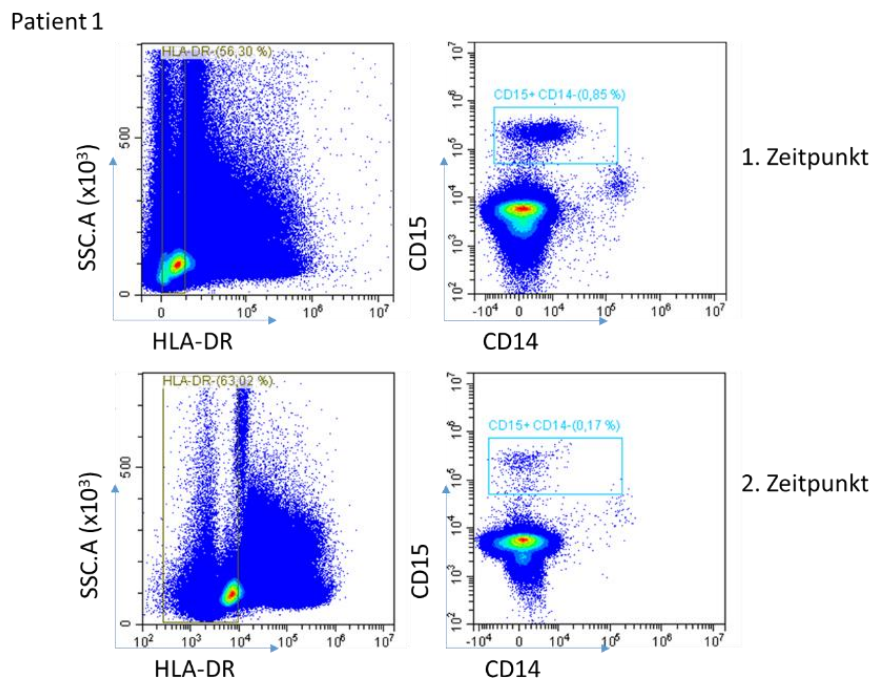
Pseudo Color Plot Darstellung. Vorausgegangenes Gating der Monozyten nicht gezeigt (Vgl. Abb. 17).

Quelle: eigene Darstellung

**Tabelle 4: Ausgewählte Konzentrationen zum Markieren der isolierten Zellen nach Titration**

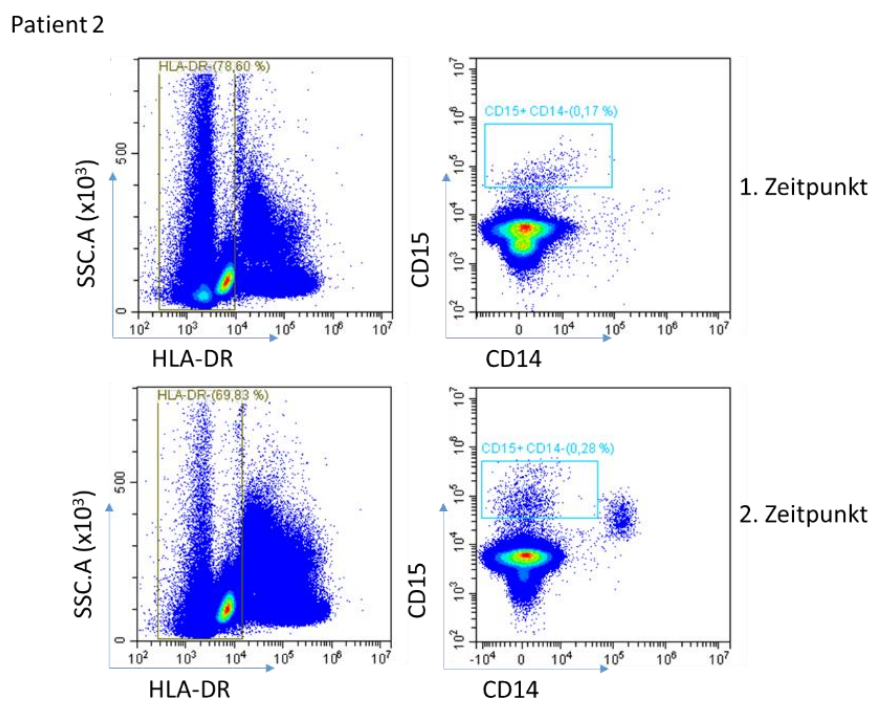
<b>Antikörper gegen Epitop:</b>	<b>ausgewähltes Volumen [µl]</b>
<b>HLA-DR</b>	<b>0.5</b>
<b>CD3</b>	<b>2</b>
<b>CD15</b>	<b>8</b>
<b>CD45</b>	<b>1</b>
<b>CD11b</b>	<b>1</b>
<b>CXCR5</b>	<b>0.2</b>
<b>CCR4</b>	<b>0.5</b>
<b>CXCR3</b>	<b>5</b>
<b>CD25</b>	<b>5</b>
<b>CRTH2</b>	<b>2</b>
<b>CD4</b>	<b>0.2</b>
<b>CD14</b>	<b>0.5</b>
<b>CD33</b>	<b>0.5</b>
<b>CCR6</b>	<b>5</b>
<b>CD127</b>	<b>0.5</b>
<b>ICOS</b>	<b>2</b>
<b>CD45RA</b>	<b>2</b>

Quelle: eigene Darstellung



**Abbildung 19: HLA-DR und CD15/CD14 Gating bei Blutabnahme am 1. und 2. Zeitpunkt von Patient 1**

Quelle: eigene Darstellung



**Abbildung 20: HLA-DR und CD15/CD14 Gating bei Blutabnahme am 1. und 2. Zeitpunkt von Patient 2**

Quelle: eigene Darstellung



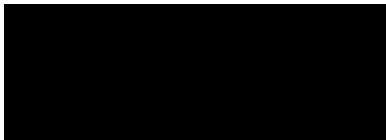
**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 14.11.2022



Miriam Fritzsche