

Autoimmunerkrankungen erfordern eine kombinierte Therapie  
aus Toleranzinduktion und Immunsuppression  
Modelluntersuchung bei der Alopecia Areata

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl. Biochem. Ulrike Erb

aus

Altdöbern

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Andrew Cato

Korreferenten: Prof. Dr. Margot Zöller

Prof. Dr. Jörg Kämper

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014

Liebe ist stets der Anfang des Wissens, so wie Feuer der Anfang des Lichtes ist.

Thomas Carlyle

Für meine Familie

In Liebe und Dankbarkeit

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>10</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Haare</b>	<b>12</b>
1.1.1 Die Struktur des Haarfollikels und der Haare	12
1.1.2 Keratine	13
1.1.3 Die Entwicklung des Haarfollikels	15
1.1.4 Der Zyklus des Haarfollikels	16
<b>1.2 Alopecia Areata</b>	<b>17</b>
1.2.1 Krankheitsbild und -verlauf	17
1.2.2 Alopecia Areata ist eine Autoimmunerkrankung	18
1.2.3 Genetische Prädisposition	24
1.2.4 Die derzeitigen Therapiemöglichkeiten der Alopecia areata	25
<b>1.3 Aspekte für neue Therapieansätze</b>	<b>26</b>
1.3.1 Induktion von Toleranz	27
1.3.2 Beeinflussung der Kostimulation über die akzessorischen Moleküle CD44 und Integrine	28
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b>	<b>34</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>35</b>
2.1.1 Chemikalien	35
2.1.2 Antikörper	37
2.1.3 Rekombinante Zytokine, Chemokine und Matrixproteine	42
2.1.4 Vektoren	42
2.1.5 Verwendete Komplettsysteme	42
2.1.6 Zelllinien	43
2.1.7 Mäuse	43
2.1.8 Peptide	43
2.1.9 Puffer und Lösungen	44

2.1.10	Instrumente und Geräte	46
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	47
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>48</b>
2.2.1	Zellbiologische Methoden	48
2.2.2	Tierexperimentelle Arbeiten	53
2.2.2.8	<i>Präpar</i>	54
2.2.3	Immunologische Methoden	55
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	58
2.2.5	Statistik	61
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>CD44v10 Expression fördert das Homing von Lymphozyten in die Haut durch Osteopontin-Bindung</b>	<b>62</b>
3.1.1	Oberflächenproteine und intrazelluläre Moleküle	62
3.1.2	Einfluss von CD44v10 auf <i>in vivo</i> Homing	64
3.1.3	Der Einfluss von CD44v10 auf <i>in vitro</i> Migration und Adhäsion	66
3.1.4	Einfluss von CD44v10 auf Proliferation und Apoptoseresistenz	70
<b>3.2</b>	<b>CD44-CD49d-Assoziation fördert Adhäsion und Migration von Lymphozyten durch Adaptermolekül-Komplexbildung in GEM</b>	<b>73</b>
3.2.1	Expression und Assoziation von CD44 und CD49d in EL4-Zellen	74
3.2.2	CD44-CD49d-Interaktion fördert Proliferation und Apoptoseresistenz	74
3.2.3	CD44-CD49d-Interaktion fördert die Lymphozyten-Aktivierung	79
3.2.4	CD44-CD49d-Interaktion fördert Adhäsion und Migration	80
3.2.5	Assoziationen des Zytoskelett mit CD44 und CD49d	82
3.2.6	Lokalisation des CD44-CD49d-Komplexes in glykolipidreichen Mikrodomänen	85
<b>3.3</b>	<b>Die Keratine K31 und K71 sind Autoantigene der Alopecia Areata</b>	<b>86</b>
3.3.1	Keratine als Autoantigene der AA	86
3.3.2	Keratin-spezifische Effektor-T-Zellen in AA betroffenen Mäusen	89
3.3.3	Induktion der Alopecia areata in C3H/HeJ-Mäusen durch DC-Vakzinierung mit K31 und K71 Peptiden93	
<b>3.4</b>	<b>Peptide der Keratine K31 und K71 können erfolgreich zur Autoantigen-spezifischen Therapie der AA eingesetzt werden</b>	<b>103</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>110</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Rolle von CD44 bei der persistierenden T-Zell-Aktivität in Autoimmunerkrankungen</b>	<b>111</b>
4.1.1	Wahl des EL4-Systems	111

4.1.2	Osteopontin vermittelt das präferentielle Einwandern von CD44v10 <sup>+</sup> T-Zellen in die Haut und verstärkt deren Aktivität	112
4.1.3	Die Assoziation von CD44 an CD49d fördert persistierende T-Zell-Aktivität	113
<b>4.2</b>	<b>Identifikation Haar-spezifischer Keratine als Autoantigene der AA – therapeutische Implikationen</b>	<b>115</b>
4.2.1	Wahl der Haar- und Nagel-spezifischen Keratine als potenzielle Antigene	115
4.2.2	DC-Vakzinierung mit Haar- und-Nagel-spezifischen Keratinen führt zur Induktion von Alopecia Areata	115
4.2.3	K31- und K71-Peptid-induzierte Toleranz und therapeutische Effizienz in AA-betroffenen C3H/HeJ-Mäusen	117
<b>4.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>119</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>141</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>142</b>
<b>9</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>143</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>144</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
%	Percentages
A	Alanin
aa	Aminosäure (amino acid)
AA	Alopecia areata
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
Ag	Antigen
AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
AIRE	<i>Autoimmune regulator</i>
Akt	Proteinkinase B
Ala	Alanin
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl2- associated death promoter protein</i> , pro-apoptotisches Protein
BAK	<i>Bcl2- homologous antagonist killer</i> , pro-apoptotisches Protein
BAX	<i>Bcl2- associated X protein</i> , Ko-faktor des Tumorsuppressors p53
Bcl2	<i>B-cell lymphoma-2</i> , anti-apoptotisches Protein
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large protein</i> , anti-apoptotisches Protein
BMC	<i>Bone marrow cells</i> , Knochenmarkszelle
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Caspase	Cysteine aspartic proteases
CCL	C-C-Chemokin-Ligand
CCR	C-C-Chemokin-Rezeptor

---

CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD44s	CD44-Standard
CD44v	CD44-Variante
cDNA	<i>Complementary DNS</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
Ci	Curie
Cpm	<i>Counts per minute</i>
Col	Kollagen
ConA	Concavalin A
cTEC	Cortex-Thymusepithelzellen
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocytes</i> , zytotoxische T-Zelle
CXCL	C-X-C-Chemokin-Ligand
CXCR	C-X-C-Chemokin-Rezeptor
d	Tag
DC	<i>Dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	<i>Delayed type hypersensitivity reaction</i> , Kontaktallergie
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELAM	<i>Endothelial leukocyte adhesion molecule</i>
ELISA	<i>Encyme linked immunosorbant assay</i>
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
EAE	Experimental autoimmune encephalitis
FAS	Todesrezeptor
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>Foetal calf serum</i> , fötales Kälberserum

---

FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FN	Fibronektin
FSC	<i>forward scatter</i>
G418	Geneticin
g	Gramm
GEM	<i>Glycolipid enriched membrane</i> , glykolipidreiche Mikrodömäne
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunden
HA	Hyaluronsäure
HLA	<i>human leucocyte antigen</i> , Humanes Leukozyten-Antigen
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HF	Haarfollikel
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IBF	Interfakultäre biomedizinische Forschungseinrichtung
ICAM	<i>intracellular adhesion moleclue</i>
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMEM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Media</i> , Zellkulturmedium
IP	Immunpräzipitation
ip.	intraperitoneal
ITAM	<i>Immunoreceptor-tyrosine based activation motifs</i>
i.v.	intravenös
kDa	Kilo-Dalton
K	Keratin
K31	Keratin 31
K71	Keratin 71
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
l	Liter



---

Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LNC	<i>Lymphnode cells</i> , Lymphknotenzelle
LPS	Lipopolysaccharid
LN	Laminin
m	Milli
M	Molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
mDC	Medulla-DC
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
mol	Mol
MS	Multiple Sklerose
mTEC	Medulla-Thymusepithelzellen
MWCO	„molecular weight cut off“
μ	Mikro
μCi	Mikrocurie
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
n	Nano
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i> , Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13- acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Phospho tyrosine kinase
PUVA	<i>Psoralen plus ultra violet A radiation</i>
rpm	<i>Revolution per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute”, Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin Kinase
S	Serin
SADBE	<i>Squaric acid dibutylester</i> , Quadratsäuredibutylester
s.c.	subkutan
SC	<i>Spleen cells</i> , Milzzellen
SCF	<i>Stem-cell factor</i>
SDF-1	<i>stromal-derived factor 1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodekylsulfat
Ser	Serine
SkIL	<i>Skin infiltrating leukocytes</i> , hautinfiltrierende Leukozyten
SPF	Spezifisch pathogenfrei
Src	Protein-Tyrosinkinase
SSC	<i>Side Scatter</i>
t	Zeit
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N’N’-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>

T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRAP	<i>Trogocytosis Assay Protocol</i>
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
V	Volts
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLA	Very late antigen
VN	Vitronektin
WB	Western Blot
w/v	<i>weight/volume</i>
Y	Tyrosin
Zap-70	Zeta associated protein
z.B.	zum Beispiel

**Abbildungsverzeichnis**

ABBILDUNG 1: AUFBAU DAS HAARES UND DES HAARFOLLIKELS	13
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KERATINEXPRESSION UND IMMUNFLUORESCENZBILDER DER EXPRESSION VON K85, K71 UND K75	15
ABBILDUNG 3: DARSTELLUNG DES ZYKLUS DES HAARFOLLIKELS	17
ABBILDUNG 4: KRANKHEITSBILD DER AA MIT TYPISCHEN KAHLSTELLEN AUF DEM KOPF	18
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PROZESSIERUNG UND PRÄSENTATION VON PEPTIDEN AN T-ZELLEN DURCH APC	20
ABBILDUNG 6: SIGNALTRANSDUKTION IN AKTIVIERTEN T-ZELLEN	21
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHER AUFBAU VON CD44	29
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ASSOZIATION VON CD44 MIT PROTEINEN DES ZYTOSKELETTES	30
ABBILDUNG 9: DIE INTEGRIN-SUPERFAMILIE UND DIE PAARUNG DER A- UND B-KETTEN	31
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES INTEGRIN-FAK-SIGNALWEGES	32
ABBILDUNG 11: EXPRESSION VON T-ZELL-MARKERN UND ZYTOKINEN SOWIE ZYTOKINREZEPTOREN IN EL4-ZELLEN UND EL4-V10-ZELLEN	63
ABBILDUNG 12: EXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND CHEMOKINEN SOWIE CHEMOKINREZEPTOREN IN EL4-ZELLEN UND EL4-V10-ZELLEN	64
ABBILDUNG 13: <i>IN VIVO</i> HOMING VON EL4 UND EL4-V10	65
ABBILDUNG 14: BINDUNG DER REKOMBINANTEN PROTEINE RCD44S UND RCD44V10 AN MATRIXPROTEINE UND CHEMOKINE	66
ABBILDUNG 15: ADHÄSION VON EL4 UND EL4-V10 <i>IN VITRO</i>	67
ABBILDUNG 16: TRANSWELL-MIGRATION VON EL4 UND EL4-V10 <i>IN VITRO</i>	68
ABBILDUNG 17: BEWEGUNG VON EL4- UND EL4-V10-ZELLEN AUF MATRIXPROTEINEN	70
ABBILDUNG 18: PROLIFERATION VON EL4- UND EL4-V10-ZELLEN	71
ABBILDUNG 19: APOPTOSERESISTENZ VON EL4- UND EL4-V10-ZELLEN	73
ABBILDUNG 20: EXPRESSION VON CD44 UND CD49D UND ASSOZIATION VON CD49D MIT PAXILLIN SOWIE FAK IN EL4-, EL4-CD49D UND EL4-MUTCD49D-ZELLEN	74
ABBILDUNG 21: PROLIFERATION VON EL4-, EL4-CD49D UND EL4-MUTCD49D-ZELLEN	75
ABBILDUNG 22: APOPTOSERESISTENZ VON EL4-, EL4-CD49D UND EL4-MUTCD49D-ZELLEN	76
ABBILDUNG 23: EXPRESSION VON CASPASEN SOWIE ANTI- UND PROAPOPTOTISCHEN MOLEKÜLEN NACH CISPLATIN-BEHANDLUNG	78
ABBILDUNG 24: AKTIVIERUNGSZUSTAND VON EL4, EL4-CD49D UND EL4-MUTCD49D NACH FN- STIMULATION	79
ABBILDUNG 25: ADHÄSION VON EL4, EL4-CD49D UND EL4-MUTCD49D <i>IN VITRO</i>	80
ABBILDUNG 26: TRANSWELL-MIGRATION VON EL4, EL4-CD49D UND EL4-MUTCD49D <i>IN VITRO</i>	81
ABBILDUNG 27: ASSOZIATION VON CD49D MIT CD44 IN EL4-CD49D UND EL4-MUTCD49D NACH HA-STIMULATION	82
ABBILDUNG 28: KOLOKALISATION VON CD44 BZW. CD49D MIT PHALLOIDIN, EZRIN, ANKYRIN UND PAXILLIN IN EL4, EL4-CD49D UND EL4-MUTCD49D NACH HA-STIMULATION	83

---

ABBILDUNG 29: KOIMMUNOPRÄZIPITATION VON CD44 MIT EZRIN, PAXILLIN, FAK UND CD49D	84
ABBILDUNG 30: AKTIVIERUNG VON SIGNALKASKADEN NACH HA- UND FN-STIMULATION	84
ABBILDUNG 31: VERTEILUNG VON CD44 UND CD49D IN DER ZELLMEMBRAN NACH FN-STIMULATION	85
ABBILDUNG 32: TROGOZYTOSE, PROLIFERATION UND IFN $\gamma$ -EXPRESSION VON NAIVEN T-ZELLEN NACH STIMULATION MIT PEPTID-BELADENEN DC	88
ABBILDUNG 33: TROGOZYTOSE VON <i>IN VITRO</i> RESTIMULIERTEN T-ZELLEN AUS NAIVEN MÄUSEN	88
ABBILDUNG 34: TROGOZYTOSE VON T-ZELLEN AUS MÄUSEN MIT AA	90
ABBILDUNG 35: PROLIFERATION UND IFN $\gamma$ -EXPRESSION VON T-ZELLEN AA BETROFFENER MÄUSE NACH STIMULATION MIT PEPTID BELADENEN DC	91
ABBILDUNG 36: ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN AA BETROFFENER MÄUSE NACH STIMULATION MIT PEPTID BELADENEN DC	92
ABBILDUNG 37: PROGRESSION DER AA NACH DC-VAKZINIERUNG	94
ABBILDUNG 38: INFILTRATION VON IMMUNZELLEN IN DIE HAUT NACH DC-VAKZINIERUNG	95
ABBILDUNG 39: ANTEIL DER IMMUNZELLEN UND EXPRESSION DER T-ZELL-AKTIVIERUNGSMARKER IN SKIL UND LNC	97
ABBILDUNG 40: EXPRESSION VON ZYTOKINEN IN SKIL UND LNC SOWIE VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN IN LNC	97
ABBILDUNG 41: ANTEIL VON REGULATORISCHEN T-ZELLEN UND MDSC IN SKIL, LNC UND SC98	
ABBILDUNG 42: TROGOZYTOSE VON T-ZELLEN AUS DC-VAKZINIERTEN MÄUSEN MIT PEPTID BELADENEN DC	99
ABBILDUNG 43: PROLIFERATION VON <i>IN VITRO</i> RESTIMULIERTEN T-ZELLEN AUS DC-VAKZINIERTEN MÄUSEN	100
ABBILDUNG 44: AKTIVIERUNG VON ZYTOTOXISCHEN T-ZELLEN NACH DC-VAKZINIERUNG	101
ABBILDUNG 45: INDUKTION VON AA NACH T-ZELL-TRANSFER	102
ABBILDUNG 46: ENTWICKLUNG DER AA NACH HAUTTRANSPLANTATION IN UNBEHANDELTEN UND PEPTID-BEHANDELTEN C3H/HEJ-MÄUSEN	104
ABBILDUNG 47: ANTEIL VON MDSC UND REGULATORISCHEN T-ZELLEN SOWIE DIE EXPRESSION SUPPRESSIVER ZYTOKINE IN SC BZW. LNC	105
ABBILDUNG 48: PROLIFERATION VON T-ZELLEN	106
ABBILDUNG 49: TROGOZYTOSE VON PEPTID-BELADENEN DC MIT T-ZELLEN	108
ABBILDUNG 50: ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN	109

# 1 Einleitung

## 1.1 Haare

### 1.1.1 Die Struktur des Haarfollikels und der Haare

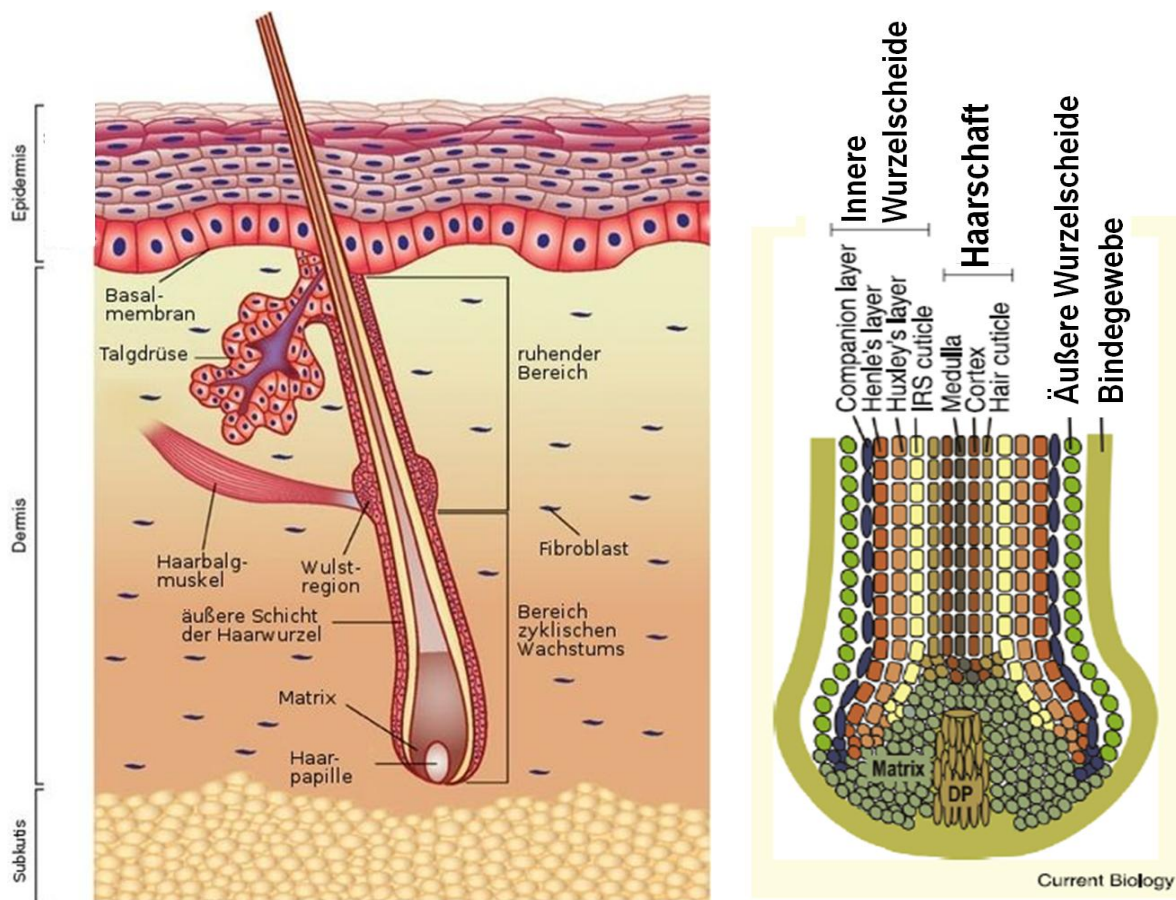
Haare sind Appendizes der Haut, des größten menschlichen Organs, und sind ein Charakteristikum von Säugetieren. Sie dienen unter anderem als Tastsinn und der Thermoregulation sowie -isolation. Haare bestehen aus einem sich zyklisch erneuernden Haarfollikel und dem permanenten Anteil des Haarschaftes (Schneider et al. 2009).

Der Haarfollikel ist in der Dermis eingebettet. Der Haarschaft ist in einen Haartrichter eingelassen, der durch Wurzelscheiden des Haarfollikels gebildet wird. Hierbei ist die äußere Wurzelscheide als Verlängerung des *Stratum basale epithelii* zu sehen. Die innere Wurzelscheide wird von Matrixzellen gebildet und verankert den Haarschaft im Haarfollikel. Die innere Wurzelscheide umgibt ebenfalls die Haarwurzel und kann in drei Schichten unterteilt werden. Die äußere Henle-Schicht, die mittlere Huxley-Schicht und die dem Haarschaft zugewandte, innerste Kutikula. Die Schichten unterscheiden sich durch ihre Keratinzusammensetzung. Der Haarschaft selbst kann ebenfalls in drei Schichten unterteilt werden. Die äußerste Schuppen-schicht oder Kutikula genannt, besteht aus flachen, übereinandergreifenden, verhornten, abgestorbenen Zellen, die eine glatte, durchscheinende Oberfläche bilden. Der Cortex, die Rinde, besteht aus Keratinfaserbündeln, die in den Cortexzellen liegen, und macht ca. 80 % des Haaranteils aus (Fuchs 2007). Die Struktur, die Reißfestigkeit und die Elastizität des Haares werden durch den Cortexaufbau bestimmt. Zum Beispiel fallen die Haare glatter, je runder der Cortex im Querschnitt ist, und sind umso lockiger, je elliptischer dieser ist. Zentral befindet sich der Markkanal, die Medulla. Diese wird durch einen sehr lockeren Faserverband gebildet, der zum Teil Hohlräume aufweist. Die Breite der Medulla bestimmt die Dicke des Haares.

Die Haarpapille, die den Haarfollikel mit Blutgefäßen und Nervenenden verbindet, ragt nicht in den Haarschaft hinein, sondern nur in die Haarbalbregion (Fuchs 2007).

Die Pigmentierung des Haares erfolgt durch die in der Balbregion befindlichen Melanozyten (Sulaimon und Kitchell 2003). Das Verhältnis von Melanozyten zu Keratinozyten beträgt circa 1:5 (Slominski et al. 2005). Melanosomen, Zellkompartimente der Melanozyten, produzieren dunkelbraunes Eumelanin und gelb-rötliches Pheomelanin, deren Konzentrationsverhältnis die Haarfarbe bestimmt (Ito und Wakamatsu 2011). Anschließend erfolgt der Transport der Melanosomen in „Pigmentkörperchen“ (pigment globules) in die Keratinozyten. Pigmentkörperchen sind Membranvesikel, die in den Filopodien der Melanozyten gebildet und sekretiert werden (Ando et al. 2011). Die Aufnahme durch die Keratinozyten erfolgt in

Abhängigkeit von Protease-activated-receptor-2 (PAR-2). Die Membran der Pigmentkörperchen wird degradiert und die einzelnen Melanosomen lagern sich um den Nucleus im Zytosol der Keratinozyten an (Ando et al. 2012)).



**Abbildung 1: Aufbau des Haares und des Haarfollikels** (verändert nach Wong und Chang, 2009; (Schneider et al. 2009))

### 1.1.2 Keratine

Keratine gehören zu den Intermediärfilamenten und bilden eine sehr große, heterogene Familie. Im Menschen sind 54 funktionelle Keratingene bekannt, wovon circa die Hälfte spezifisch im Haarfollikel exprimiert wird (Moll et al. 2008). Die Gene sind nummeriert und werden mit *Krt x* abgekürzt, die dazugehörigen Proteine mit K und der entsprechenden Nummer *K x* (Schweizer et al. 2006). Keratine werden auf Grund ihres Laufverhaltens im 2D-Gel in Typ I/saure Keratine und Typ II/basische bis neutrale Keratine unterschieden (Moll et al. 1982). Die Gene für die Typ I Keratine außer *Keratin18* (*Krt18*) werden auf Chromosom 17 codiert (Rogers et al. 2004), die für die Typ II Keratine und *Krt18* auf Chromosom 12 (Rogers et al. 2005).

Keratine besitzen eine Kopf- und Schwanzdomäne sowie eine  $\alpha$ -helikale Stabdomäne. Das Molekulargewicht beträgt zwischen 44kD und 66kD (Moll et al. 2008). Sie bilden distinkte Heterodimere aus je einem Typ I und einem Typ II Keratin, die durch weitere Zusammenlagerung Keratinfilamente bilden. Diese Keratinfilamente binden an Desmosomen und Hemidesmosomen (Waschke 2008). Sie erfüllen dadurch stabilisierende Funktion in der Zelle sowie im Zellverband. Weitere funktionelle Aufgaben, etwa Apoptoseschutz von K8 oder K17 (Caulin et al. 2000; Tong und Coulombe 2006), wurden beschrieben. Neben den „weichen“, epithelialen Zytokeratinen existieren „harte“ trychozytische Keratine, auch Haarkeratine genannt, aus denen Haare und Nägel gebildet werden. Sie unterscheiden sich durch ihren hohen Schwefelanteil (Cystin) in ihrer Kopf- bzw. Schwanzdomäne. Keratinfilamente werden mittels Keratin-assoziierten Proteinen zu Bündeln kreuzvernetzt (Rogers et al. 2006).

#### ***1.1.2.1 Haarfollikel spezifische Epithelkeratine***

In dieser Gruppe sind vier Typ I (*Krt25*, *Krt26*, *Krt27*, *Krt28*) und vier Typ II (*Krt71*, *Krt72*, *Krt73*, *Krt74*) Keratingene identifiziert, die spezifisch in der inneren Haarwurzelscheide exprimiert werden (Langbein et al. 2002; Langbein et al. 2004; Langbein et al. 2006), und *Krt75* (Typ II), das nur in der Glashaut, der Haarmedulla und im Nagelbett exprimiert wird (Wang et al. 2003).

K25, K27, K28 und K71 sind in allen Schichten der inneren Haarwurzelscheide nachweisbar, K74 wird nur in der Huxleyschicht und K28, K72 und K73 nur in der Kutikula exprimiert. Haar-spezifische Krankheiten konnten mit Mutationen des Keratins K71 in Mäusen identifiziert werden. So wurde in RCO3-Mäusen eine heterozygote Deletion von 10bp im Exon1 festgestellt, die zu missgebildeten, leicht herausziehbaren Haaren führt. Bei der homozygoten Deletion kommt es zum Haarausfall. Die Ca<sup>Rin</sup>-Mutation führt zu einer 3bp-Deletion im Exon1 wodurch die Struktur der inneren Wurzelscheide gestört ist, so dass nur fettiges und sprödes Haar wächst (Schweizer et al. 2007).

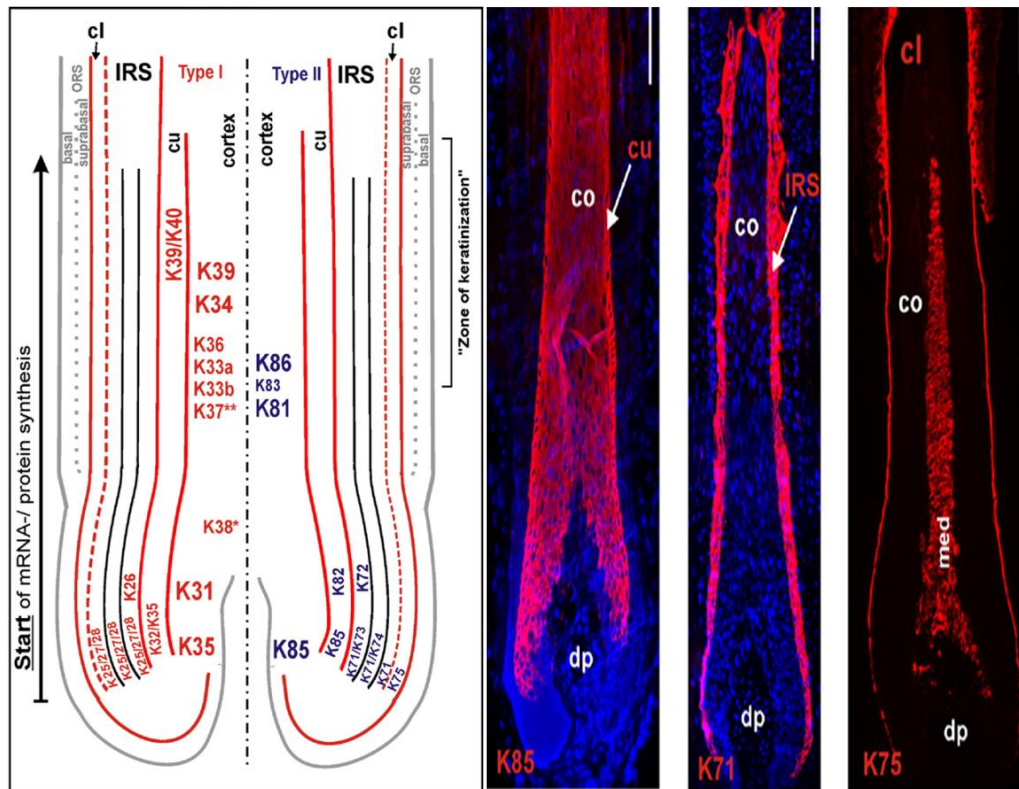
Mutationen in *Krt75* führen zur Pseudofolliculitis barbae, die zu entzündlichem Einwachsen der Barthaare führt (Winter et al. 2004).

#### ***1.1.2.2 Keratine des Haarschafts***

17 Keratine, davon elf Typ I (K31, K32, K33a, K33b, K34, K35, K36, K37, K38, K39, K40) und sieben Typ II (K81, K82, K83, K84, K85, K86) Keratine, bilden den harten Anteil des Haarschafts und zeigen ein komplexes Expressionsmuster (Perrin et al. 2004; Moll et al. 2008). Während K35 und K85 bereits in der Cortexmatrix und der Kutikula exprimiert werden, werden die anderen Keratine sequentiell im Verlauf der weiteren Differenzierung und



Keratinisierung exprimiert (Langbein et al. 2004). Mutationen des Keratins K85 verursacht ektodermale Dysplasie des Haares und der Nägel, die durch kompletten Haar- und Nagelausfall gekennzeichnet ist (Naeem et al. 2006).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Keratinexpression und Immunfluoreszenzbilder der Expression von K85, K71 und K75**

Rot: Keratinexpression, blau: Kernfärbung (DAPI-Färbung)

Abk: cl: Glashaut (companion layer); co: Cortex; cu: Kutikulla; dp: Haarpapille; IRS: innere Wurzelscheide; med: Medulla; ORS: äußere Wurzelscheide (verändert nach (Moll et al. 2008))

### 1.1.3 Die Entwicklung des Haarfollikels

Der Haarfollikel entsteht während der fötalen Hautentwicklung aus ektodermalen, pluripotenten Progenitorzellen, die sich zu allen epithelialen Zelltypen des Haarfollikels und ebenso zu den Talgdrüsen differenzieren. Mesodermale Progenitorzellen bilden die Haarpapille und die Bindegewebs-scheide (Taylor et al. 2000; Schmidt-Ullrich und Paus 2005).

In der Epidermis herrscht ein Gradient aus Aktivatoren und Inhibitoren. Haarkeime werden an Stellen, an denen die Schwellenkonzentration der Aktivatoren überschritten wird, gebildet. Hierbei wirkt Wnt/ $\beta$ -Catenin aktivierend (Huelsen et al. 2001), während Proteinen der BMP-Familie (bone morphogenic protein) inhibieren, so dass haarlose Stellen in der Haut entstehen (Andl et al. 2002; Atit et al. 2006). In den folgenden Stadien verdicken sich die Haarkeim-

zellen und wachsen senkrecht in die Haut (Chiang et al. 1999). In der Organogenese werden die äußere sowie die innere Wurzelscheide und der Haarschaft durch weitere Proliferation und Differenzierung der Haarkeimzellen gebildet. Währenddessen entwickelt sich die Papille aus dermalen Fibroblasten, die sich direkt unterhalb des Haarkeims befinden. In der anschließenden Zytodifferenzierung entstehen die einzelnen Schichten der inneren Wurzelscheide und das Schaftes (Schneider et al. 2009).

#### 1.1.4 Der Zyklus des Haarfollikels

Die zyklische Reifung des Haarfollikels wird durch Wnt/ $\beta$ -Catenin und BMP-Proteine beeinflusst und besteht aus drei Phasen (Stenn und Paus 2001).

In der Anagenphase, der aktiven Wachstumsphase, proliferieren und differenzieren Matrixzellen, die aus Haarfollikelstammzellen reifen, in sämtliche haarspezifische Zelltypen (Plikus et al. 2011). Durch die immer neuen Zellteilungen, werden ältere Zellen in Richtung der Hautoberfläche gedrängt. Die Zellen der äußeren und inneren Wurzelscheide sowie die Zellen des Haarschaftes verhornen/keratinisieren zunehmend. Nach vollständiger Keratinisierung sterben diese Zellen ab und bilden als Trichozyten zusammen mit einer dichten Matrix aus Keratinfilamenten das sichtbare Haar (Oshima et al. 2001).

Nach der Anagenphase kommt es während der Katagenphase zur Apoptose der Matrixzellen sowie der Keratinozyten der äußeren und inneren Wurzelscheide. Infolgedessen wird der Haarschaft von der Papille getrennt. Der untere Teil des Haarfollikels bildet sich zurück, wodurch die Haarpapille in die unmittelbare Nähe zur Wulstregion, in der sich die Haarfollikelstammzellen befinden, kommt. Der alte Haarschaft verbleibt im Haarkanal bis das neue Haar ihn herauschiebt oder er durch mechanischen Stress herausgezogen wird (Rendl et al. 2005).

Anschließend durchläuft der Haarfollikel eine Ruhephase, die Telogenphase genannt wird. Diese kann wiederum in zwei Phasen unterteilt werden, die sich in ihren BMP-Aktivitäten unterscheiden. In der ersten Phase, direkt nach der Katagenphase, verhindert die hohe BMP-Aktivität eine Stimulation der Haarfollikelstammzellen in der Wulstregion. Anschließend sinkt die BMP-Aktivität und die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivität nimmt zu, sodass auch die Stimulierbarkeit der Stammzellen zunimmt (Plikus et al. 2008). Hierfür ist die direkte Interaktion der Papille mit den Stammzellen nötig, da diese die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signale verstärkt und weitere anagenphase-induzierenden Signale (BMP-Antagonist Noggin, Sonic hedgehog) vermittelt (Botchkarev et al. 1999; Botchkarev et al. 2002). Sobald die Konzentration der Aktivatoren über der Aktivierungsschwelle liegt, wird eine neue Anagenphase ausgelöst. Durch die

räumliche Trennung der Wulstregion zur Haarpapille, erhöht sich die relative BMP-Aktivität in der Wulstregion und die Haarfollikelstammzellen werden wieder in einen Ruhezustand versetzt, während die aktivierten Tochterzellen sich in Matrixzellen differenzieren (Hsu et al. 2011).

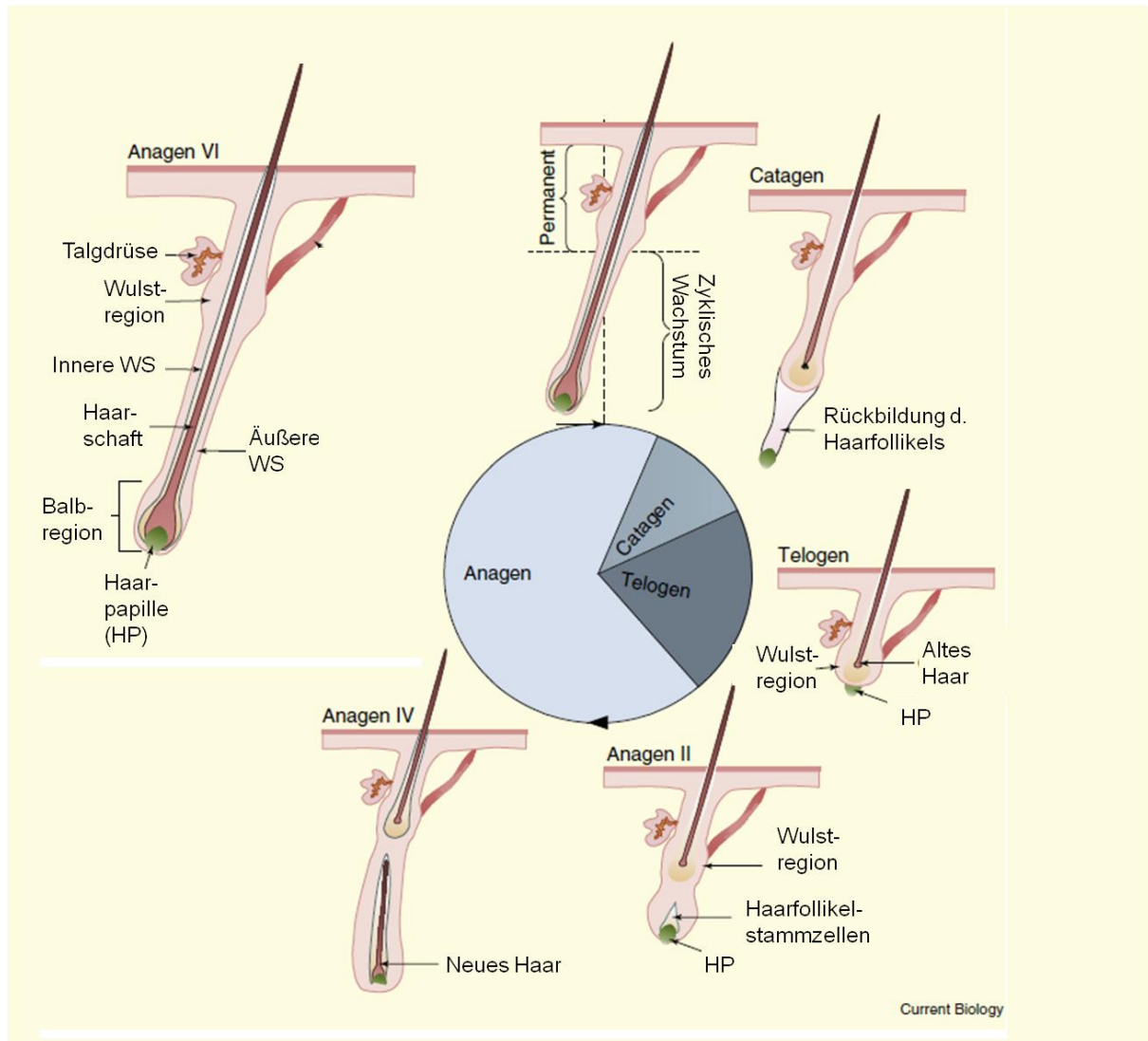


Abbildung 3: Darstellung des Zyklus des Haarfollikels (verändert nach Schneider et al. 2009)

## 1.2 Alopecia Areata

### 1.2.1 Krankheitsbild und -verlauf

Alopecia Areata (AA) führt zu Haarausfall in Form kreisrunder Stellen unterschiedlicher Größe im Haupthaar, daher weithin als *Kreisrunder Haarausfall* bekannt. AA kann sich in extremen Fällen zu *Alopecia totalis*, d.h. Ausfall des gesamten Haupthaars, und *Alopecia universalis*, bei der die gesamte Körperbehaarung fehlt, weiterentwickeln (Lu et al. 2006). Die

Krankheit tritt alters- und geschlechtsunabhängig mit 1,7% Wahrscheinlichkeit in der Gesamtbevölkerung auf (Safavi et al. 1995). Der Verlauf der AA ist durch akute Phasen von Haarausfall charakterisiert, die sich mit Phasen spontanen Haarwachstums abwechseln. Die Kahlheit kann jedoch bis zu mehrere Jahre anhalten. Bei schweren Formen der AA können auch Veränderungen an den Nägeln, wie kleinere Dellen, Rillen und/oder rotgepunktete Lumulae, auftreten. Histologische Untersuchungen von Hautbiopsien betroffener Regionen, die zur Diagnose herangezogen werden, zeigen für AA typische peri- und intrafollikuläre Ansammlungen von Lymphozyten um die Balbregion der Haare, die sich in der Anagenphase befinden (Perret et al. 1984; Sundberg et al. 1994). Weiterhin ist eine Verkleinerung des Haarfollikels zu beobachten, jedoch nicht dessen Zerstörung. Narbenbildung des Gewebes tritt nicht auf. Weiter Organe sind von dieser Krankheit nicht betroffen.



**Abbildung 4: Krankheitsbild der AA mit typischen Kahlstellen auf dem Kopf**

### **1.2.2 Alopecia Areata ist eine Autoimmunerkrankung**

Die In AA gefundene Leukozyteninfiltration um betroffene Haarfollikel sowie Untersuchungen in Tiermodellen zeigen, dass AA eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist (Kalish und Gilhar 2003). Autoimmunerkrankungen werden über die starke Reaktivität von Lymphozyten gegenüber körpereigenem Gewebe bzw. körpereigenen Proteinen definiert.

#### ***1.2.2.1 Die T-Zell-vermittelte Immunreaktion***

Da AA eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist, soll im Folgenden die T-Zell-vermittelte Immunreaktion näher erläutert werden. Die T-Zell-vermittelte Immunreaktion

gehört zur adaptiven Immunantwort, die durch eine hohe Diversität und durch die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses charakterisiert ist. Die hohe Diversität der Antigen-Rezeptorketten durch Rekombinationsereignisse ermöglicht die Erkennung einer Vielzahl von Antigenen. Die wichtigsten Zelltypen der adaptiven Immunantwort sind B- und T-Zellen (Salam et al. 2013).

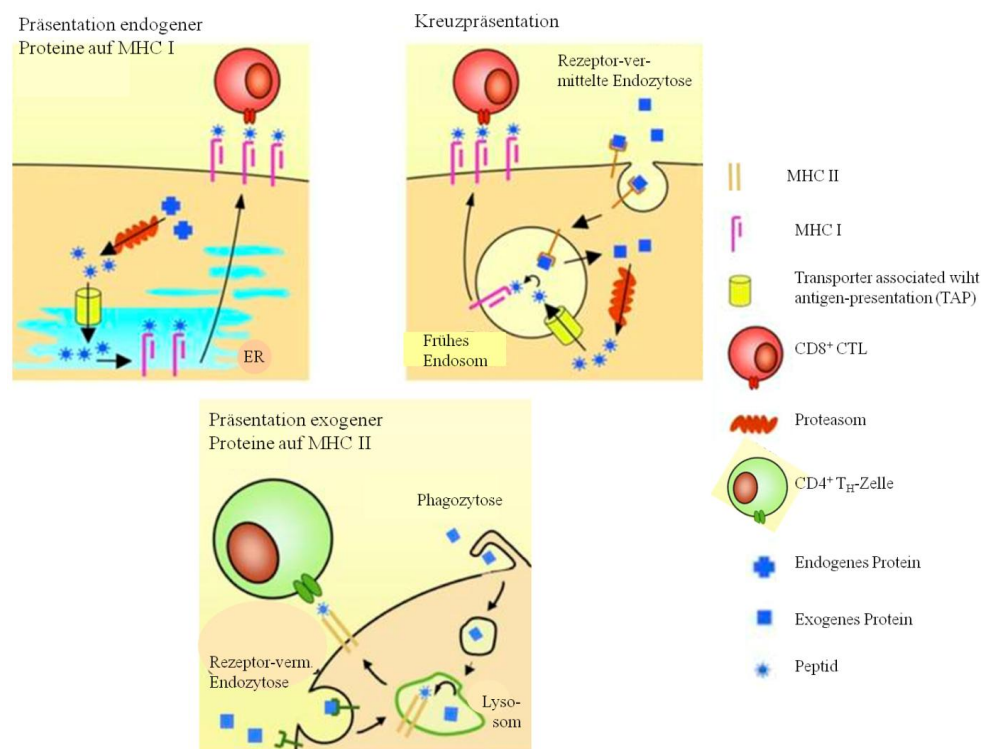
T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wandern in den Thymus, wo die Rekombination des T-Zellrezeptors und die Reifung zu naiven  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen ( $T_H$ -Zellen) und  $CD8^+$  Zytotoxischen T-Zellen (CTL) erfolgt (Sambandam et al. 2005).

Diese wandern anschließend in die sekundären lymphatischen Organe, z.B. Lymphknoten. Für eine optimale Immunreaktion ist die Aktivierung der naiven, Antigen-spezifischen T-Zellen und deren klonale Expansion erforderlich. Die Aktivierung erfolgt über die Interaktion der T-Zellen mit Antigen präsentierenden Zellen (APC), die für eine optimale Aktivierung mindestens zwei Signale übermitteln. Das erste Signal erfolgt über die Bindung des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) auf APC mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR). MHC bilden einen Komplex mit prozessierten Peptiden und präsentieren diese als Antigene (Fooksman et al. 2010). Der humane MHC wird auch *Human Leukocyte Antigen* (HLA) genannt. Das zweite Signal ist die Kostimulation. Das Fehlen der Kostimulation führt zur Apoptose oder Anergie (Ruhigstellung) der T-Zellen (Acuto und Michel 2003).

Dendritische Zellen (DC) sind die professionellsten APC. Diese differenzieren aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und zirkulieren zwischen den verschiedenen peripheren Organen und den sekundären lymphatischen Organen (Belz und Nutt 2012). Die Zirkulation und das Einwandern werden durch P- und E-Selektine auf Endothelzellen vermittelt (Dorrie et al. 2008). Unreife DC exprimieren MHC sowie kostimulatorische Moleküle schwach und besitzen eine hohe phagozytotische bzw. pinozytotische Aktivität in den peripheren Organen (Lutz und Schuler 2002). Die aufgenommenen Proteine werden im lysosomalen Kompartiment zu Peptiden verdaut und prozessiert, lösen jedoch keine T-Zell-Aktivierung aus, da mit der Präsentation keine Kostimulation erfolgt. Erst durch die Stimulation der DC durch sogenannte Gefahrensignale reifen DC vollständig und exprimieren verstärkt beladene MHC-Moleküle und kostimulatorische Moleküle (Lutz und Schuler 2002). Exogene Gefahrensignale sind Liganden von Bakterien, Viren oder Helminthen, die über Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt werden. So wird bakterielles Lipopolysaccharid von TLR4 gebunden (Li und Wang 2014). Endogene Gefahrensignale sind Substanzen, die von beschädigten Körperzellen freigesetzt werden. Hierzu zählt u.a. ATP oder F-Aktin, das normalerweise nur intrazellulär vorkommt, aber von nekrotischen Zellen in die extrazelluläre



Matrix abgegeben wird (Ahrens et al. 2012). Exogene Gefahrensignale sind nach entzündlichen Prozessen oder Verletzungen sezernierte Zytokine, so sezernieren Keratinozyten in Folge einer Entzündung IL1 $\beta$ , das aktivierend auf DC wirkt (Xu et al. 2014). Reife DC exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7, der die Liganden CCL19 (*macrophage inflammatory protein 3 $\beta$* , MIP3 $\beta$ ) und CCL21 (*6Ckine*) bindet und die Migration in die T-Zell-Zone in sekundären lymphatischen Organen fördert (Manzo et al. 2007). In der T-Zell-Zone der Lymphknoten erfolgt die als „priming“ bezeichnete Aktivierung der naiven CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch reife DC (Fooksman et al. 2010). CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen erkennen Peptide von exogenen, phagozytierten Proteinen, die auf Klasse II MHC-Moleküle (MHC II) präsentiert werden, und CD8<sup>+</sup> CTL erkennen sowohl endogene als auch exogene Peptide, die auf Klasse I MHC-Moleküle (MHC I) präsentiert werden (Salam et al. 2013). MHC I werden von allen Körperzellen exprimiert, während MHC II nur von APC exprimiert werden. Die Prozessierung der Proteine und die Beladung der MHC ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Im Falle einer Autoimmunerkrankung wird ein wirtseigenes Antigen erkannt.



**Abbildung 5: schematische Darstellung der Prozessierung und Präsentation von Peptiden an T-Zellen durch APC** (verändert nach (Burgdorf et al. 2007))

Das zweite Signal der Aktivierungskaskade, das kostimulatorische Signal, wird über Liganden der B7-Familie, die auf reifen DC exprimiert werden, vermittelt. B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) sind Glycoproteine der Immunglobulin-Superfamilie und bilden Homodimere. CD28,

der Rezeptor für beide Liganden, wird konstitutiv auf T-Zellen exprimiert und gehört ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie (Acuto und Michel 2003).

Die Signaltransduktion erfolgt über die  $\zeta$ -Kette des TCR-CD3-Komplexes und den Korezeptor CD4 bzw. CD8. CD3 besteht aus drei verschiedenen Immunglobulin-ähnlichen Dimeren, nämlich  $\epsilon\delta$ ,  $\epsilon\gamma$  und  $\zeta\zeta$  bzw.  $\zeta\eta$ . Nach der Antigen-MHC-Erkennung wird *lymphocyte protein-tyrosine kinase* (Lck) über CD4 oder CD8 aktiviert. Aktivierte Lck phosphoryliert *Immunoreceptor-tyrosine based activation motifs* (ITAM) in der  $\zeta$ -Kette, die nun eine Bindungsstelle für das  $\zeta$ -chain associated protein ZAP-70 bildet. ZAP-70 wird ebenfalls durch Lck aktiviert und löst über weitere Aktivierungsereignisse u.a. den MAP-Kinase/Erk-Signalweg und  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx aus, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1 sowie des T-zellspezifischen Transkriptionsfaktors NFAT und zur Transkription der Interleukin (IL) 2-Gene führen. Diese Signale regulieren die Effektorfunktionen, die Zytokinexpression, die Zellproliferation und Apoptose (Smith-Garvin et al. 2009). Die Kostimulation über CD28 verstärkt die Effektorfunktionen der T-Zellen über PI3K-Aktivierung (Acuto und Michel 2003).

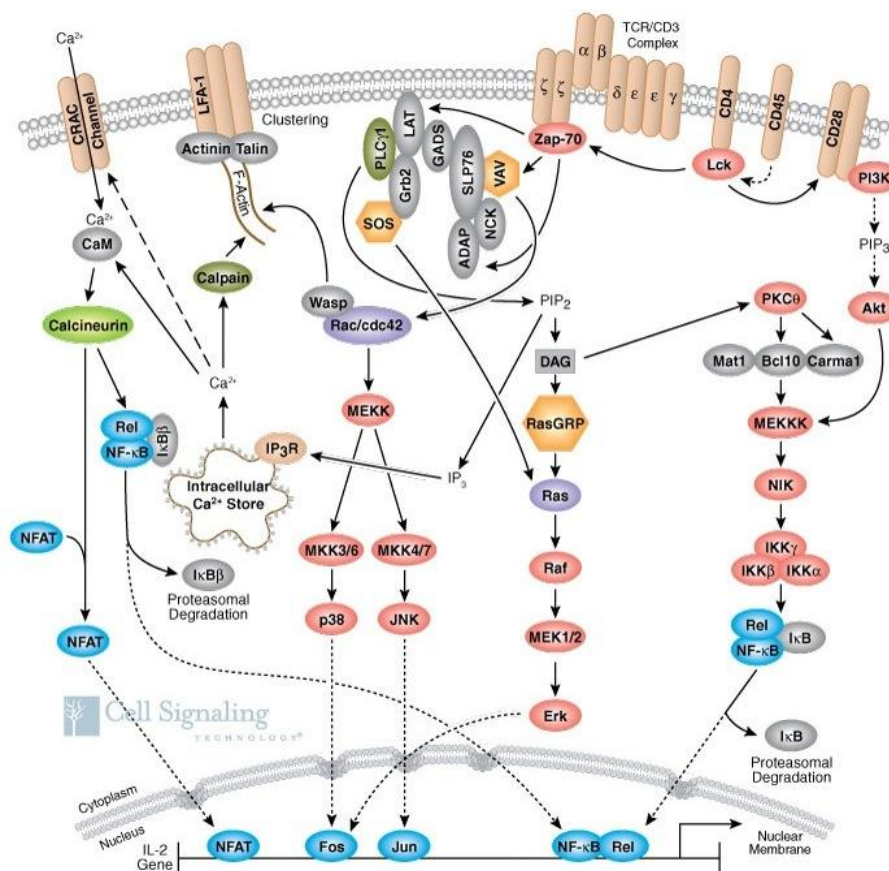


Abbildung 6: Signaltransduktion in aktivierten T-Zellen (nach Cell Signaling technologies)

In Abhängigkeit des Zytokinmikromilieus erfolgt- neben der Aktivierung- die Polarisierung der naiven  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen in  $T_{H1}$ -Zellen oder in  $T_{H2}$ -Zellen. Das Zytokinmikromillieu wird durch DC, Zellen der angeborenen Immunantwort, etwa Makrophagen, und bereits polarisierte  $T_H$ -Zellen gebildet. IL12 fördert die  $T_{H1}$ -Differenzierung.  $T_{H1}$ -Zellen sezernieren vor allem Interferon  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) und IL2. Diese Zytokine verstärken die CTL-Antwort und erhöhen die Aktivität von Makrophagen sowie Natürlichen Killerzellen. Die sezernierten  $T_{H1}$ -Zytokine hemmen zudem die Differenzierung von naiven  $T_H$ -Zellen zu  $T_{H2}$ -Zellen.  $T_{H2}$ -Zellen sezernieren überwiegend IL4, IL5 sowie IL10 und verstärken die humorale Immunantwort der B-Zellen, fördern die Antikörper-Sekretion sowie den Ig-Klassenwechsel.  $T_{H2}$ -Zellen erhöhen die Aktivität der eosinophilen Granulozyten und Mastzellen (Liao et al. 2011).

Die aktivierten Effektor-T-Zellen verlassen die lymphatischen Organe über die efferenten Lymphe und wandern gezielt zur Entzündungsstelle im Gewebe. Dieser Prozess wird *Homing* genannt (Freyschmidt-Paul et al. 2000). CTL lysieren von Pathogenen befallene oder entartete Körperzellen durch die Sekretion von Perforin und GranzymB nach erneuter Antigenerkennung (Smith-Garvin et al. 2009). Bei der T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankung AA zerstören CTL Zellen des Haarfollikels.

Die Immunantwort und das Verhindern einer überschießenden Immunreaktion werden über mehrere Mechanismen reguliert. Zum einen wird der Rezeptor CTLA4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, CD152), ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, nach T-Zell-Aktivierung exprimiert. CTLA4 bindet CD80 und CD86 mit einer höheren Affinität als CD28 und inhibiert die T-Zellaktivität (Dilek et al. 2013). Zum anderen sezernieren regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ), eine weitere  $T_H$ -Subpopulation, die konstitutiv CD4, CD25 und den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimiert, die Zytokine IL10 und *Transforming Growth Factor*  $\beta$  ( $TGF\beta$ ). Die Zytokine wirken suppressiv auf die Immunreaktion und begünstigen die Polarisation von aktivierten  $T_H$ -Effektorzellen zu induzierten  $T_{reg}$ . In vielen Autoimmunerkrankungen sind  $T_{reg}$  herunterreguliert (Sakaguchi et al. 2008).

Einige Effektor-T-Zellen entwickeln sich zu Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen schneller und stärker reagieren (Lanzavecchia und Sallusto 2005). Diese Restimulierbarkeit wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet und ist ein Charakteristikum der adaptiven Immunantwort.



### 1.2.2.2 Nachweis AA als Autoimmunerkrankung

Der Nachweis, dass AA eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist, wurde zum einen durch die Leukozyteninfiltration um betroffene Haarfollikel untermauert (Perret et al. 1984), zum anderen durch Untersuchungen in Tiermodellen bestätigt.

Der gesunde anagene Haarfollikel besitzt einen sogenannten immunprivilegierten Status (Christoph et al. 2000). Dies ist ein aktiver Prozess zur Suppression einer möglichen Immunantwort. Zum einen befinden sich im Haarfollikel und in der Haut in diesem Status kaum Immunzellen. Die MHC I Expression auf Keratinozyten und Melanozyten ist supprimiert, hingegen sezernieren diese die suppressiv wirkenden Substanzen  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone ( $\alpha$ MSH), TGF $\beta$  und *Macrophage migratory Inhibiting Factor* (MIF) (Paus et al. 2003; Ito et al. 2008). Die vorhandenen APC in der Haut bzw. Haarfollikel sind funktionell eingeschränkt, da diese kein MHC II exprimieren (Christoph et al. 2000). Ein Zusammenbruch des Immunprivilegs ist entscheidend für die Entstehung der AA wie im Tierversuch gezeigt wurde. Durch die intravenöse Gabe von IFN $\gamma$ , einem massiven Stimulus für eine Immunreaktion, konnte AA in C3H/HeJ-Mäusen induziert werden (Gilhar et al. 2005). Der Mausstamm C3H/HeJ, der AA spontan entwickelt bzw. in dem AA durch Hauttransplantation von betroffenen Spendermäusen in naiven Empfängern induziert werden kann, wird als Modell genutzt (Sundberg et al. 1994; McElwee et al. 1998).

Neben der massiven Infiltration von Lymphozyten in peri- und intrafollikuläres Gewebe während einer florierenden AA, ist auch die Anzahl von APC erhöht. Zudem herrscht ein inflammatorisches Mikromilieu, das durch die verstärkte Expression von IL1, IL2, IL4 und IFN $\gamma$  initiiert wird (Teraki et al. 1996). Weiterhin wird durch entzündliche Prozesse die Expression von MHC I sowie MHC II auf Epithelgewebe des Haarfollikels stark erhöht (Zhang und Oliver 1994). Ebenso werden die Adhäsionsmoleküle Interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM) sowie Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmolekül (ELAM) auf Endothelzellen benachbarter Blutgefäße verstärkt exprimiert (Zhang und Oliver 1994). Dies führt zur verstärkten Migration von Lymphozyten in das Gewebe und deren Aktivierung.

In AA betroffenen Tieren, bei denen selektiv entweder CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen depletiert wurden, war anschließend ein erneutes Haarwachstum zu beobachten (McElwee et al. 1996, 1999). Weiterhin konnte in T-Zell-Transferstudien eindeutig nachgewiesen werden, dass AA eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist. Hierbei konnte AA in naiven Empfängertieren induziert werden, wenn CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen betroffener Tiere injiziert wurden. Durch die Gabe von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen konnte nur ein lokal begrenzter Haarausfall induziert werden. Eine systemische AA, die durch multiple Stellen mit Haaraus-

fall charakterisiert ist, konnte mittels Injektion von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Helfer-Zellen induziert werden. Dies ging mit der Aktivierung von Lymphozyten und APC des Empfängers einher. Hingegen konnte mittels suppressiv wirkenden T<sub>reg</sub> (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) von AA betroffenen Tieren Haarausfall in den Empfängern verhindert werden, wenn T<sub>reg</sub> zusammen mit CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen injiziert wurden (McElwee et al. 2005).

Diese Analysen zeigen, dass AA eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist, deren Prognose und Therapie durch verschiedene Faktoren bestimmt wird, wie Patientenalter zu Beginn der Krankheit, Dauer der Akutphase und Auftreten sowie Art der Nagelveränderungen. Je früher AA auftritt und je persistierender die einzelnen Schübe der AA verlaufen, desto schwerer ist der weitere Verlauf mit häufiger Etablierung einer *Alopecia totalis* oder *Alopecia universalis* (Kos und Conlon 2009).

### 1.2.3 Genetische Prädisposition

AA wird nicht nach Mendel'schen Gesetzen vererbt, aber häufig tritt AA bei Patienten auf, die bereits eine familiäre Vorgeschichte haben, so dass von einer genetischen Prädisposition ausgegangen wird (Kos und Conlon 2009). Genetische Untersuchungen zeigen einen möglichen Zusammenhang zwischen AA und Chromosomen, die für das Immunsystem wichtige Gene kodieren. So sind verschiedene Gene der Haupthistokompatibilitätsantigene HLA I und HLA II auf Chromosom 6 mit der Anfälligkeit und der Schwere von AA assoziiert. Allel HLA DRB1\*1104 ist vermehrt in Patienten mit AA exprimiert und DRB1\*0401 sowie DQB1\*0301 sind mit schweren Formen der *Alopecia totalis* und *universalis* assoziiert (Barahmani et al. 2008; Gilhar et al. 2007). Weiterhin wurden assoziierende Genloci, die für immunmodulatorisch wirkende Zytokine kodieren, identifiziert. Hierzu zählen die Gene für IL1 $\beta$  (Chromosom 2) sowie TNF $\alpha$  (Chromosom 6), deren verstärkte Expressionen eine fortschreitende Aktivierung des Immunsystems bewirken (Tarlow et al. 1994; Galbraith und Pandey 1995; Galbraith et al. 1999). Außerdem sind die Genloci für leichte und schwere Kette der Immunglobuline (Chromosom 14) mit der Schwere der AA assoziiert, so dass stark erhöhte Titer von Autoantikörpern, die gegen Strukturen des Haarfollikels gerichtet sind, im Serum von Patienten mit persistierender AA nachweisbar sind (Galbraith et al. 1984; Galbraith und Pandey 1989). Ein genetischer Zusammenhang wird zu Chromosom 21 vermutet, da AA in Patienten mit Trisomie 21 verstärkt auftritt (Du Vivier und Munro 1975) und die Krankheit Autoimmunes-Polyendokrinopathie-Candidiasis-Ektodermales-Dystrophie-Syndrom Typ 1, die durch *Autoimmune regulator* (AIRE)-Mutationen auf Chromosom 21 ausgelöst wird, mit AA assoziiert ist (Wengraf et al. 2008).

#### 1.2.4 Die derzeitigen Therapiemöglichkeiten der Alopecia areata

Die medikamentöse Therapie der AA sollte an die unterschiedlichen Formen angepasst und auch als Langzeittherapie eingesetzt werden können. Immunsuppressive Therapien eignen sich zur Behandlung von AA nur bedingt, da sie in der Regel mit starken Nebenwirkungen verbunden sind. Hierzu zählt die Verabreichung von Corticosteroiden, wobei nur die intraläsionale Injektion effektiv Haarwachstum fördert, jedoch zum Teil sehr schmerzhaft für die Patienten ist und aus praktikablen Gründen nur für kleine Stellen zur Kurzzeittherapie geeignet ist (Frentz 1977; Alkhalifah 2011). Die topikale Applikation hingegen zeigt, auf Grund geringer Penetranz in die Haut, kaum Wirkung (Montes 1977; Alkhalifah 2011). Systemisch, oral verabreichte Corticosteroide müssten in zu starken Dosen eingesetzt werden, so dass die Nebenwirkungen, wie Leber- und Nierenschäden, Diabetes und Osteoporose, den Einsatz bei einer nicht lebensbedrohlichen, aber psychisch belastenden Autoimmunerkrankung nicht rechtfertigen (Dillaha und Rothman 1952; Seiter et al. 2001). Zu den immunsuppressiven Therapien gehört die topikale oder orale Gabe von Psoralen, das in Kombination mit Bestrahlung mit ultravioletttem Licht A (PUVA) genutzt wird. Der erzielte Erfolg der Therapie wird durch die hohe Rückfallquote vermindert (etwa 30%-50% erfolgreich behandelte Patienten) (Taylor und Hawk 1995). Außerdem ist die Bestrahlung mit UVA durch das erhöhte Risiko für die Entwicklung eines malignen Melanoms ebenfalls nicht für die Langzeittherapie geeignet. Die derzeit effektivste Therapie ist die immunmodulatorisch wirkende Erzeugung eines leichten Ekzems mittels eines Kontaktallergens, bei dem Juckreiz und Rötung, jedoch noch keine Pusteln oder Nässen auftritt (Singh und Lavanya 2010). Als Allergen werden Diphenylcyclopropen (DPCP) oder Quadratsäuredibutylester (SADBE) eingesetzt. Die Therapieeffizienz liegt bei etwa 50% und erneutes Haarwachstum tritt meist 8-12 Wochen nach Therapiebeginn auf (Rokhsar et al. 1998; Ajith et al. 2006). Es treten zum Teil akute, aber reversible Nebenwirkungen auf, wie Bläschenbildung, allergene Kontaktdermatitis, Pigmentstörungen. Chronische, irreversible Nebenwirkungen sind nicht beschrieben. Die Wirkungsweise beruht zum Teil auf einem geänderten Verhältnis von  $CD4^+$  zu  $CD8^+$  T-Zellen um den Haarfollikel und einer gestörten Migration sowie Rezirkulation von APC zwischen Haut und dränierenden Lymphknoten, wodurch keine optimale Aktivierung der T-Zellen mehr gegeben ist (Gupta et al. 2006). Zudem ist die Expression der für die Aktivierung benötigten MHC-Moleküle auf Epithelzellen reduziert. Zum anderen wird in Folge der Behandlung die Anzahl myeloider Suppressorzellen (MDSC) im Gewebe drastisch erhöht. Diese können T-Zellen supprimieren (Marhaba et al. 2007; Singh et al. 2011).

Als MDSC wird eine heterogene Gruppe von Zelltypen bezeichnet, die sich aus unreifen myeloiden Progenitorzellen sowie Vorläuferzellen von Makrophagen, Granulozyten und DC zusammensetzt (Gabrilovich et al. 2007). Unreife myeloide Zellen entstehen während der Hämatopoese, die im Knochenmark stattfindet, und differenzieren zu Makrophagen, Granulozyten und DC weiter. In peripheren Organen werden diese migrierten, unreifen myeloiden Zellen als MDSC bezeichnet und wirken stark suppressiv auf T-Zellen und andere Lymphozyten (Marigo et al. 2008). MDSC exprimieren sowohl Gr1 (Ly6G und Ly6C) als auch CD11b und können in zwei Subpopulationen unterschieden werden und spiegeln die verschiedenen Stadien der myeloiden Zellreifung wider. „Granulozyten“-MDSC sind  $CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{wenig}$ . „Monozyten“-MDSC sind  $CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{hoch}$ . Der suppressive Mechanismus unterscheidet sich bei den MDSC-Subpopulationen (Condamine und Gabrilovich 2011). Beide haben eine hohe Arginase1 Expression, aber G-MDSC supprimieren T-Zellen hauptsächlich über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mit engem Zell-Zell-Kontakt, während M-MDSC hauptsächlich über *Nitric oxid synthetase* (iNOS) und die Produktion von NO inhibieren (Youn et al. 2008). Chronische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen fördern die Entstehung von MDSC durch TLR-Aktivierung und die Zytokine  $IL1\alpha$ ,  $IL10$  sowie  $IL12$  (Condamine und Gabrilovich 2011). In *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (EAE), dem Mausmodell der humanen Multiplen Sklerose (MS) akkumulieren MDSC in der Milz (Zhu et al. 2007), in Kontaktallergen behandelten Mäusen akkumulieren MDSC in Haut und Milz, diese sind in der Lage T-Zellen *in vitro* zu inhibieren (Singh et al. 2011). Weiterhin ist im Mikromilieu vermehrt suppressiv wirkendes  $IL10$  und weniger aktivierendes  $IFN\gamma$  nachweisbar (Singh et al. 2011). Im Allgemeinen ist die Behandlung mit Kontaktallergen die effektivste Therapiemöglichkeit der AA, aber zum Teil eine sehr zeitintensive und in etwa 50% der Fälle ineffektive Therapie, so dass neue und spezifischere Wege gefunden werden müssen.

### 1.3 Aspekte für neue Therapieansätze

AA ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, die zudem mit einer stark psychischen Belastung für die Betroffenen einhergeht. Neue Therapieansätze müssen daher langfristig wirken, keine starken Nebenwirkungen haben und eine schnelle psychische Entlastung bringen. Die effektivste Therapie bei Autoimmunerkrankungen ist die Toleranzinduktion gegen das initiiierende Antigen, allerdings war dies im Falle der AA bisher unbekannt. Diese Form der Hyposensibilisierung wird ebenso bei Allergien eingesetzt (Sabatos-Peyton et al. 2010).

Außerdem können immunmodulatorische Therapieansätze weiterentwickelt werden. Hierzu zählt die Manipulation der kostimulatorischen Signale über akzessorische Moleküle, die zu einer persistierenden T-Zell-Aktivität führen (Marhaba et al. 2006).

### 1.3.1 Induktion von Toleranz

#### 1.3.1.1 Toleranzmechanismen und MDSC

Toleranz ist ein Charakteristikum des adaptiven Immunsystems. Die Toleranz kann in zentrale und periphere Toleranz unterteilt werden. Zentrale Toleranzinduktion findet im Thymus während der T-Zell-Reifung statt und wird durch den Prozess der Negativ-Selektion vermittelt. Hierbei führt die Erkennung eines Antigens mit hoher Avidität zu Apoptose der T-Zelle. Ebenso erfolgt die Differenzierung zu natürlichen  $T_{reg}$  im Thymus.

Zunächst durchlaufen die Thymozyten die Positiv-Selektion, bei der sie mit ihrem TCR den wirtseigenen MHC-Komplex erkennen müssen, der auf Cortex-Thymusepithelzellen (cTEC) exprimiert wird. Die nachfolgende Negativ-Selektion findet in der Medulla des Thymus statt. Eigene, gewebespezifische Proteine/Peptide werden verstärkt in MHC-Komplexen auf Medulla-Thymusepithelzellen (mTEC) präsentiert (Espinosa et al. 2013). mTEC exprimieren AIRE, einen Transkriptionsfaktor mit E3-Ubiquitinligaseaktivität, der die Expression der präsentierten Proteine und deren proteasomalen Abbau fördert (Danso-Abeam et al. 2013). Bestimmte Mutationen von AIRE sind mit AA assoziiert (Wengraf et al. 2008).

In den Hassalschen Körperchen kommt es zur Differenzierung der natürlichen  $T_{reg}$ . Hassalsche Körperchen exprimieren *thymic stromal lymphopoietin*, das Dendritische Zellen der Medulla (mDC) aktiviert, die wiederum die konstitutive Expression von CD25 und des Transkriptionsfaktors FoxP3 in  $CD4^+$  Thymozyten auslösen (Watanabe et al. 2005).

Als periphere Toleranz wurde die Induktion von  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+ T_{reg}$  in  $CD4^+ T_H$ -Zellen in den peripheren Organen durch TGF $\beta$  sowie IL10 bezeichnet.

Zur Therapie der AA werden immunmodulatorische, jedoch nicht selektive Mechanismen zur Förderung der Suppression eingesetzt. z.B. durch die Behandlung mit Kontaktallergen, die sowohl die DC-Aktivität reduziert als auch  $T_{reg}$ - und MDSC-Aktivität propagiert (Singh et al. 2011).

#### 1.3.1.2 Autoantigen-spezifische Toleranzinduktion

Zur Inuktion von Toleranz wird das initiiierende Antigen in tolerogenen Form, d.h. ohne kostimulatorische Adjuvantien in wässriger Lösung, in entweder sehr hoher oder sehr niedri-

ger Dosis verabreicht. Häufig ist das induzierende Autoantigen wie im Falle der AA unbekannt und/oder mehrere Autoantigene können beteiligt sein.

In klinischen Studien als auch Mausmodellen zu Diabetes Typ1 sowie zur MS zeigen Vakzinierungen mit hohen Peptid-Dosen in der Regel stärkere Effekte durch Induktion von IL10 sezernierenden  $T_{reg}$ , aber die Gefahr möglicher Nebenwirkungen, die besonders am Anfang der Therapie auftreten, ist ebenfalls größer (Sabatos-Peyton et al. 2010). Im EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*), dem Mausmodell der MS, wurden IgG1- und IgE-Antikörper gegen das Peptid gebildet, die zu einem anaphylaktischen Schock führten (Smith et al. 2005). Geringen Peptid-Dosen zeigen schwächere therapeutische Effekte, aber kaum Nebenwirkungen. Wiederholt erfolgt nur Anergieinduktion in autoantigenspezifischen Effektor-T-Zellen, jedoch keine Differenzierung von  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen zu  $T_{reg}$ , die für einen langfristigen Erfolg nötig sind (Saraiva et al. 2009). Deshalb wird häufig eine schrittweise Erhöhung der Dosis vorgeschlagen um sowohl Anergiemechanismen als auch  $T_{reg}$  zu induzieren.

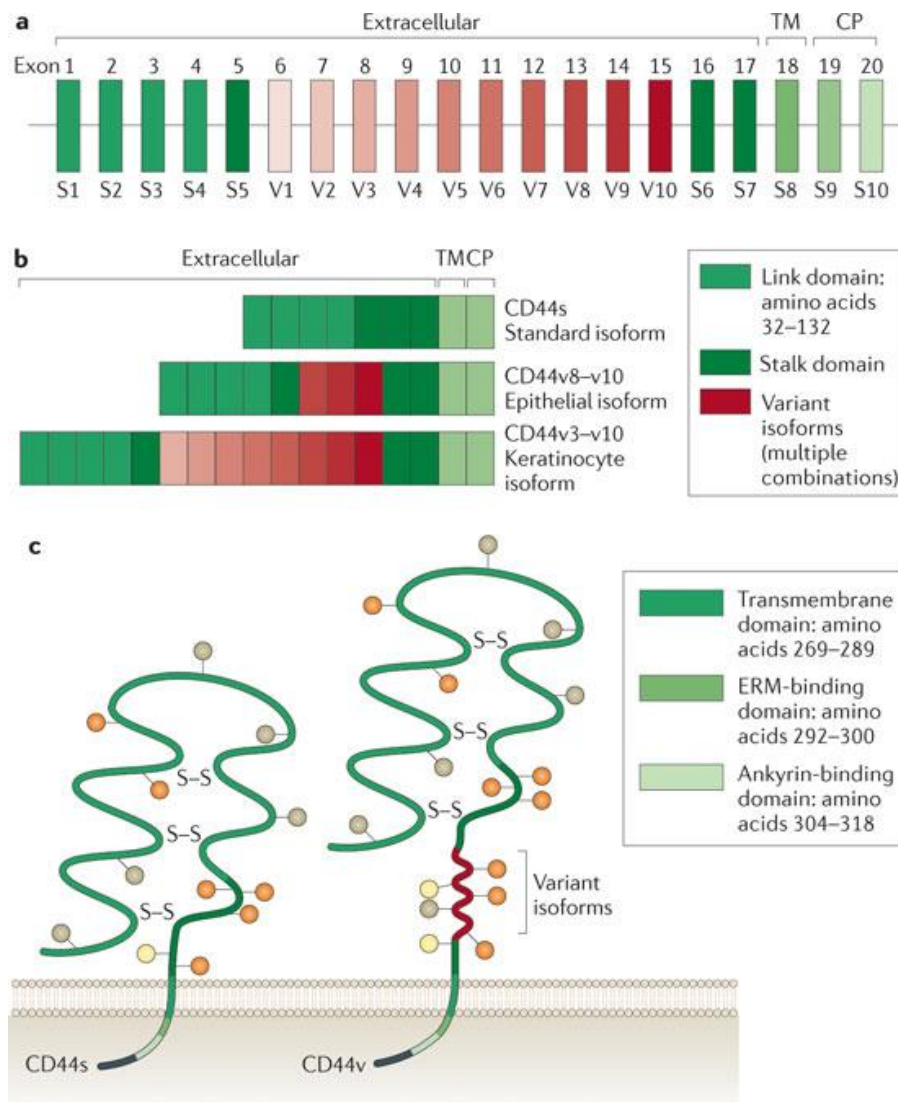
Das Stadium der Erkrankung ist für den Erfolg der Therapie entscheidend, z.B. konnte Diabetes Typ1 im Mausmodell durch eine autoantigenspezifische Immuntherapie in frühen Phasen mit dem initiierenden Peptid verhindert werden, während im späten Stadium ein Mix mehrerer Peptide verabreicht werden mussten (Vanderlugt und Miller 2002). Dies zeigt die häufig auftretende Vergrößerung des Pools an Autoantigenen im Verlauf einer Autoimmunerkrankung.

Die Anzahl sowie die Zeit zwischen den einzelnen Antigenapplikationen und die gesamte Therapiedauer sind in den einzelnen Studien sehr unterschiedlich und können zwischen einigen Wochen bis hin zu Monaten betragen (Koffeman et al. 2009; Muller et al. 2008; Thrower et al. 2009; Warren et al. 2006).

### **1.3.2 Beeinflussung der Kostimulation über die akzessorischen Moleküle CD44 und Integrine**

Die Adhäsionsmoleküle der Leukozyten sind wichtige Regulatoren der Zell-Matrix- bzw. der Zell-Zell-Adhäsion. Sie steuern die Zellzirkulation, das *Zellhoming* und die Transmigration durch das Endothelgewebe (Nandi et al. 2004). Sie sind zudem an Kostimulation, Zytotoxizität und Apoptose beteiligt. CD44 ist in diesem Zusammenhang ein wichtiges Adhäsionsmolekül in Autoimmunerkrankungen wie der AA (Estess et al. 1998; Marhaba et al. 2006).

CD44 ist ein ubiquitinär exprimiertes, transmembranspannendes Glykoprotein, das u.a. Hyaluronsäure bindet (Zöller 2011).



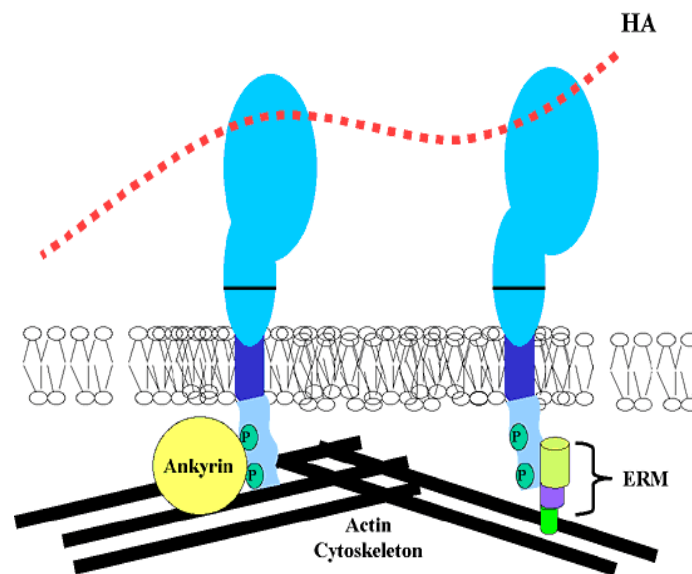
Nature Reviews | Cancer

**Abbildung 7: schematischer Aufbau von CD44: (A) genomische Anordnung, (B) mRNA, (C) Protein (nach (Zöller 2011))**

Im humanen System wird das Gen auf Chromosom 11p13 codiert und besitzt 20 Exons (Goodison et al. 1999). Exon 1 bis 4 kodieren für den extrazellulären Loop, wobei die Exons 2 und 3 die HA-Bindungsstelle codieren. Die Exons 5, 16 und 17 bilden die Stammdomäne des Standard-CD44s, auch hämatopoetisches CD44s genannt, das die kürzeste Isoform des CD44 darstellt. Weitere Isoformen werden als variante CD44-Isoformen (CD44v) bezeichnet und entstehen durch Einfügung der translatierten Exons 6 bis 15, als variante Exons v1 bis v10 beschrieben, z.B. wird in Keratinozyten die Kombination der Exons v3 bis v10 exprimiert (CD44v3-v10). Die Transmembrandomäne wird durch Exon 18 und die zytoplasmatische Domäne durch Exon 20 kodiert. Die Transkription und Translation des Exon 19 führt zu ei-

nem verkürzten CD44-Protein ohne funktionelle, zytoplasmatische Domäne. Das CD44-Protein bindet an HA. Die 100aa lange HA-Bindungsstelle von CD44 weist eine hohe Homologie zu anderen HA-bindenden Proteinen auf (Goodison et al. 1999). Weitere CD44-Liganden der extrazellulären Matrix sind Fibronectin, Vitronectin und Kollagene. CD44 bindet auch Chemokine, Zytokine sowie Wachstumsfaktoren (Zöller 2011).

Die durch CD44-Aktivierung ausgelöste Erhöhung der Motilität der Lymphozyten wird durch Umordnung des Aktin-Zytoskelettes erreicht, aber CD44 selbst besitzt keine Aktin-Bindungsstelle, sondern nutzt Adaptermoleküle wie Ankyrin und Proteine der ERM-Familie (Ezrin, Radixin, Moesin) (Tsukita et al. 1994).

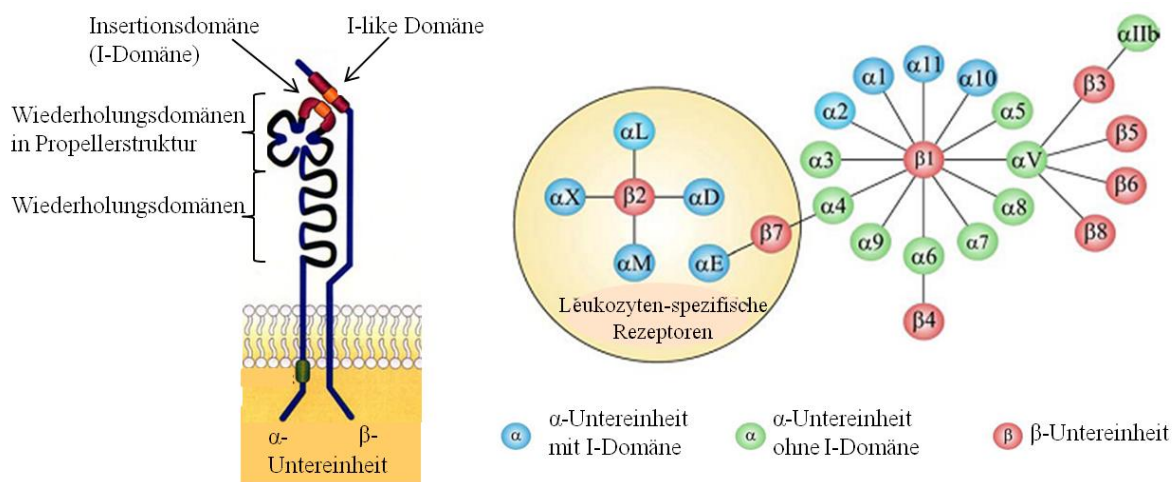


**Abbildung 8:** schematische Darstellung der Assoziation von CD44 mit Proteinen des Zytoskelettes (verändert nach (Knudson und Knudson 1999))

Für die erfolgreiche Signaltransduktion sind posttranslationelle Modifikationen von CD44 ausschlaggebend. Während der Wachstumsphase der Zelle und Zellmigration ist CD44 konstitutiv an Ser325 phosphoryliert, das als Bindungsstelle für ERM-Proteine fungiert, diese haben eine C-terminale F-Aktin-Bindungsstelle und können zur Umordnung des Zytoskelettes beitragen. Während der Ruhephase hingegen ist Ser291 des CD44 phosphoryliert und Merlin binden kann, ein ERM-Protein verwandtes Molekül ohne F-Aktin-Bindungsstelle, so dass keine Signaltransduktion stattfindet (Peck und Isacke 1996). Weiterhin erhöhen die Palmitylierungen an Cys286 und/oder Cys295 die Affinität zu dem Adaptermolekül Ankyrin, verringern aber die Assoziation zum CD3-Komplex in T-Zellen (Guo et al. 1994). Die Kostimulation von T-Zellen erfolgt ebenfalls durch assoziierte Rezeptortyrosinkinasen und Phosphotyrosinkinasen. So kann die Assoziation mit aktiviertem Lck bei suboptimaler Aktivierung des TCR-CD3-Komplexes zu einem kostimulatorischen



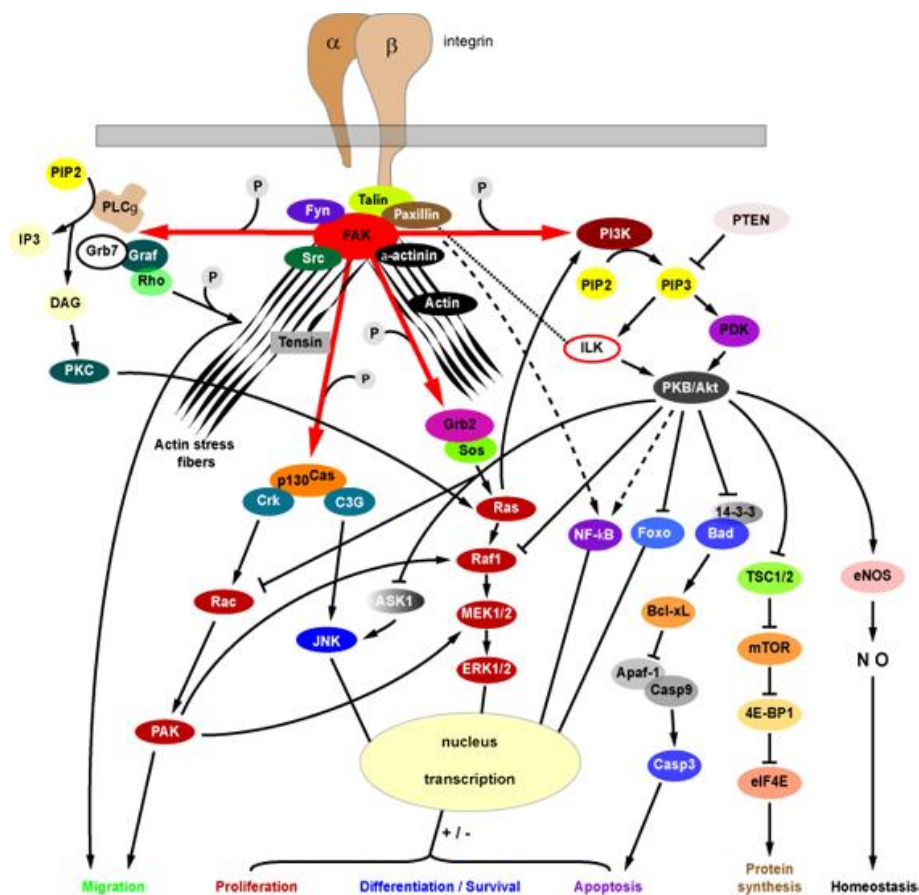
Signal führen, das zur Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweges und Expression von IL2-Genen führt (Ilangumaran et al. 1998). Eine TCR-unabhängige Aktivierung ist möglich, wenn CD44 mit anderen aktivierten Tyrosinkinase assoziiert bzw. durch die Assoziation mit Integrinen Zugang zu diesen erhält. Integrine setzen sich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zu 24 distinkten Heterodimeren im Menschen zusammen (Hynes 2002). Sie sind Zelloberflächenrezeptoren, die Interaktionen mit der extrazellulären Matrix und mit anderen Zellen vermitteln. Beide Ketten sind Glykoproteine, die einmal die Zellmembran durchspannen. Die extrazellulären Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette assoziieren miteinander und bestimmen die Ligandspezifität, z.B. bindet das Integrin  $\alpha4\beta1$  (VLA-4, CD49d) Fibronectin (FN) (Duarte et al. 2012). Durch die Bindung an die extrazelluläre Matrix formen sich Integrincluster in der Zellmembran, die durch Assoziation mit Zytoskelettproteinen und Signaltransduktionsmolekülen einen fokalen Adhäsionspunkt ausbilden. An diesem Adhäsionspunkt werden später die Lamellopodien ausgebildet, die die Bewegungsrichtung der Zelle vorgeben (Hynes 2002).



**Abbildung 9: Die Integrin-Superfamilie und die Paarung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten** (Niu 2011)

Durch die Assoziation der Integrine mit der zytosomatischen Tyrosinkinase FAK (*focal adhesion kinase*) wird die Migration, Adhäsion, Apoptose und Proliferation der Zellen gesteuert (Tomar und Schlaepfer 2009). FAK besteht aus der N-terminalen FERM-Domäne, die Homologie zu Ezrin, Radixin und Moesin aufweist, einer zentralen Kinase-Domäne und C-terminal eine Lokalisationsequenz an den fokalen Adhäsionspunkt (*Focal adhesion targeting sequence, FAT*) (Schaller et al. 1995). Nach Bindung an die extrazelluläre Matrix ändert sich die Konformation der Integrin- $\beta$ -Kette und ermöglicht die FAK-Assoziation. Die Konformationsänderung von FAK führt zur Autophosphorylierung an Y397. FAK assoziiert im aktivierten Zustand mit PI3K, das den Akt-Signalweg und so die Inhibition der Apoptose fördert (Chen et al. 1996). Aktiviertes FAK aktiviert außerdem die Tyrosinkinase Src, die

wiederum FAK an Y576, Y577 und Y925 phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung an Y925 entsteht eine Bindungsstelle für Grb2, das den Ras-MAP-Kinase-Weg aktiviert (Schlaepfer et al. 1994). Der FAK-Src-Komplex aktiviert zudem p130Cas und Endophilin A2. Aktives Endophilin A2 reduziert die Endozytose von MT1-MMP (*membrane-type1-Matrix-Metalloprotease*) und führt zu einer erhöhten Oberflächenexpression von MT1-MMP, die die Degradation der extrazellulären Matrix steigert und die Migration der Zellen fördert (Wu et al. 2005). Weiterhin kann CD44 durch MT1-MMP geschnitten werden. Die gesplattene zytoplasmatische Domäne von CD44 kann in den Nukleus translozieren und als Transkriptionsfaktor u.a. für CD44 wirken (Isacke und Yarwood 2002).



**Abbildung 10:** schematische Darstellung des Integrin-FAK-Signalweges (nach (Ruegg und Mariotti 2003))

Die Assoziation von CD44 mit CD49d in Lymphozyten von AA betroffenen Mäusen führt zu erhöhter Motilität der Leukozyten, verstärkter Proliferation und Apoptoseresistenz, da CD44 Zugang zu FAK und CD49d zu Ick und Ezrin erhält (Marhaba et al. 2006). Dies unterstützt eine persistierende T-Zell-Aktivität in AA.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von CD44 mit anti-panCD44- oder mit einem anti-CD44v10-Antikörper eine AA-Induktion verhindert. Die Antikörperblockade führt zu

einer gestörten Migration der stimulierten T-Zellen in die Lymphknoten und die Haut bei anti-panCD44 bzw. nur in die Haut bei anti-CD44v10 (Freyschmidt-Paul et al. 2000).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Alopecia Areata (AA) ist eine organspezifische T-Zell-vermittelt Autoimmunerkrankung des Haarfollikels und für viele Patienten mit psychischen Belastungen verbunden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten neue therapeutische Ansätze für die AA ermöglichen, da noch keine optimalen, kurativen Behandlungen etabliert sind. Die effektivste derzeitig eingesetzte Therapie ist die Induktion eines milden Kontaktekzems, die zur Expansion von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) führt. In Vorarbeiten dieses Labors wurde im Tiermodell gezeigt, dass eine Blockade der akzessorischen Moleküle CD44s und der varianten Isoform CD44v10 der Beginn der AA durch Inhibition des Lymphozyten-*homing* in die Haut verzögert werden konnte. Weiterhin wurde die Assoziation und Kooperation von CD44 mit CD49d in aktivierten AA-Effektorzellen beschrieben, die die Proliferation, Migration und Apoptoseresistenz der Lymphozyten erhöhten. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht geklärt. Eine effektivere Behandlung der AA wäre eine Autoantigen-spezifische Therapie, wofür zunächst das initiiierende Autoantigen identifiziert werden musste. Da AA keine lebensbedrohliche Erkrankung ist, ist sie ein gutes Modell für organspezifische Autoimmunerkrankungen, um die Mechanismen immunmodulatorischer Interventionen zu untersuchen ohne iatrogene Veränderungen oder einen krankheitsbedingten Kollaps des Immunsystems berücksichtigen zu müssen.

Ziel dieser Arbeit war daher die Beantwortung folgender Fragen:

1. Worin ist der Einfluss von CD44s und CD44v10 auf das T-Zell-*Homing* und deren Aktivierung begründet?

Dazu wurde die Thymomzelllinie EL4, die konstitutiv CD44s exprimiert, mit CD44v10 stabil transfiziert. Die CD44v10-spezifischen Interaktionen mit dem Milieu/der Matrix, die das Migrations- und Extravasationsverhalten beeinflussen, wurden *in vitro* und *in vivo* untersucht.

2. Wie beeinflusst die CD44-CD49d-Assoziation die persistierende T-Zellaktivität?

Um zu zeigen, dass die Assoziation von CD44 und CD49d essentiell für die erhöhte Proliferation, Migration und Apoptoseresistenz ist, wurde EL4 mit CD49d oder mit mutiertem CD49d, das keine Signaltransduktion ermöglicht, transfiziert.

3. Ist eine Autoantigen-spezifische Therapie für die AA möglich?

Auf Grund der strikten Begrenzung der AA auf Haarfollikel wurden Haarfollikel spezifische Epithelkeratine sowie Haarkeratine auf ihr immunogenes Potenzial *in vitro* und *in vivo* untersucht. Durch die Applikation in tolerogener Form wurde die therapeutische Wirkung der identifizierten Autoantigene getestet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Für die Herstellung von Lösungen und Puffer wurden ausschließlich Chemikalien der Reinheit *p.a.* oder höher verwendet.

Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
3-amino-9-ethyl-carbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
Annexin V	Becton Dickinson, Heidelberg
Bradford Reagent	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE)	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
cis-Diaminplatinum(II)dichlorid (Cisplatin)	Sigma-Aldrich, München
Concavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich, München
Dietholamin	AppliChem, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Entwicklerlösung	Agfa healthcare, Bonn
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Ficoll	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fischgelatine	Carl Roth, Karlsruhe
Fixierlösung	Agfa healthcare, Bonn
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	GIBCO, Darmstadt
G418 Sulfat	PAA, Pasching, Österreich

Glycerin	Applichem, Darmstadt
Glyzin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, München
IMEM Zellkulturmedium	GIBCO, Darmstadt
Ionomycin	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ketamin (Ketanset S)	Pfizer GmbH Deutschland, Berlin
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	AppliChem, Darmstadt
Lubrol MX	Serva, Heidelberg
Lipopolysaccharid (LPS)	Calbiochem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mayers Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, München
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Mowiol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodekylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Optifluor O	Perkin Elmer, Rodgau
Pageruler™ Prestained Protein Ladder MBI	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin-G	Sigma-Aldrich, München
Phalloidin-Rhodamine	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München

Phorbolmyristatacetat (PMA)	Sigma-Aldrich, München
Phosphataseinhibitor PhosSTOP	Roche Diagnostik, Mannheim
p-Nitrophenylphosphat-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Ponceau-S-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Propidiumiodid	Calbiochem, Darmstadt
Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostik, Mannheim
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Mix)	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Zellkulturmedium	GIBCO, Darmstadt
Quadratsäuredibutylester (SADBE)	Klinikapotheke Marburg
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, München
Sulfobiotin-X-NHS	Calbiochem, Darmstadt
N,N,N'N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
[6- <sup>3</sup> H]-Thymidine	Amersham/GE Healthcare, Freiburg
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt
Xylazin (Rompun)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen

## 2.1.2 Antikörper

### 2.1.2.1 Primärantikörper

Anti-Actin	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Akt	Becton Dickinson, Heidelberg

---

Anti-phospho-Akt	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Ankyrin	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-BAD	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-p-BAD	Cell Signalling, Frankfurt
Anti-Bak	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Bcl2	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-BclXL	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Caspase 3 active	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Caspase 8	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Caspase 9	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Caspase 9 cleaved	Cell Signalling, Frankfurt
Anti-CCL20	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CCL21	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CCL22	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CCL27	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CCR4	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CCR6	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CCR7	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CCR8	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CCR9	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CD3	Abcam Cambridge UK
Anti-CD4 (Klon: YTA)	European Animal Cell Culture collection, UK
Anti-CD8 (Klon: YTS169)	European Animal Cell Culture collection, UK
Anti-CD11a	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD11b (Klon: YBM)	European Animal Cell Culture collection, UK
Anti-CD11c	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD16/32	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD18	Becton Dickinson, Heidelberg



---

Anti-CD25	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD28	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD29	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD31	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD40	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD44 (Klon: IM7)	American type culture collection
Anti-CD44v6	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD44v10 (Klon: K926)	American type culture collection
Anti-CD49d (Klon: PS/2)	American type culture collection
Anti-CD54 (Klon: YN1/1.7.4)	American type culture collection
Anti-CD61	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD62L	Immunotools, Friesoythe
Anti-CD69	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD80	Immunotools, Friesoythe
Anti-CD86	Immunotools, Friesoythe
Anti-CD90	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD95	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD95L	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD102	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD103	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD106	Biozol Diagnostica, Eching
Anti-CD120a (TNFR I)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD120b (TNFR II)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD126 (IL6R)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD152 (CTLA-4)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD154 (CD40L)	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD210 (IL10R)	Biozol Diagnostica, Eching
Anti-c-jun	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-c-jun	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-CXCL10 (IP10)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

---

Anti-CXCL12 (SDF1 $\alpha$ )	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CXCR3	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-CXCR4	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-ERK1/2	Santa cruz, Heidelberg
Anti-phospho-ERK1/2	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Ezrin	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-phospho-Ezrin	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-FAK	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-phospho-FAK	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-FoxP3	Biozol Diagnostica, Eching
Anti-Gr1	Immunotools, Friesoythe
Anti-IFN- $\gamma$ <i>capture</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-IFN- $\gamma$ <i>detection</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-IFN- $\gamma$ -Rezeptor	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-IL2	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-IL6	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-IL7	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-IL10	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-IL12	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-JNK	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-phospho-JNK	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Ick	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-Ick	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-MEK1	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-MEK1	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-OPN	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-p38	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-p38	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Paxillin	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-PI3K	Santa Cruz, Heidelberg

Anti-phospho-PI3K	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-PKC	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-phospho-PKC	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-PLC	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-phospho-PLC	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Src	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-phospho-Src	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-TCR $\alpha\beta$	Immunotools, Friesoythe
Anti-TCR $\gamma\delta$	Immunotools, Friesoythe
Anti-TGF- $\beta$	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-TNF- $\alpha$	Becton Dickinson, Heidelberg

#### ***2.1.2.2 Sekundäre Antikörper und Streptavidin-Konjugate***

anti-Hamster IgG APC	Dianova, Hamburg
anti-Hamster IgG FITC	Dianova, Hamburg
anti-Hamster IgG PE	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen APC	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen Cy2	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen Cy3	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen FITC	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen PE	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG APC	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG FITC	Dianova, Hamburg
anti-Maus IgG PE	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG APC	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG Biotin	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG Cy2	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG Cy3	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG FITC	Dianova, Hamburg
anti-Ratte IgG PE	Dianova, Hamburg
Streptavidin AP	Dianova, Hamburg

Streptavidin APC	Dianova, Hamburg
Streptavidin FITC	Dianova, Hamburg
Streptavidin HRP	Dianova, Hamburg
Streptavidin PE	Dianova, Hamburg

### 2.1.3 Rekombinante Zytokine, Chemokine und Matrixproteine

Collagen Typ I	Sigma-Aldrich, München
Collagen Typ IV	Sigma-Aldrich, München
Fibronectin	Sigma-Aldrich, München
Hyaluronsäure	Sigma-Aldrich, München
Laminin 111	Sigma-Aldrich, München
Maus-CXCL10 (IP10)	Biotrend, Köln
Maus-CXCL12 (SDF1 $\alpha$ )	Immunotools, Friesoythe
Maus-IL-2	Immunotools, Friesoythe
Maus-IL-4	Immunotools, Friesoythe
Maus-GM-CSF	Immunotools, Friesoythe
Maus-SCF	Immunotools, Friesoythe
Osteopontin	Biotrend, Köln
Vitronectin	Immunotools, Friesoythe

### 2.1.4 Vektoren

rCD44s-pCEP4	Dr. P. Gupta, Invitrogen, Darmstadt
CD44v10-pcDNA3.1 (+)	Dr. P. Gupta, Invitrogen, Darmstadt
CD44v10-pCEP4	Dr. P. Gupta, Invitrogen, Darmstadt
CD49d-pcDNA3.1 (+)	Dr. V. Singh, Invitrogen, Darmstadt
CD49d-S988A-pcDNA3.1 (+)	Dr. V. Singh, Invitrogen, Darmstadt

### 2.1.5 Verwendete Komplettsysteme

ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Freiburg
---	--------------------

VECTASTAIN ABC Kit Vektor Labs, Burlingame, CA, USA

### 2.1.6 Zelllinien

EL4 murine Thymomzelllinie American Type Culture Collection  
 EL4-v10 EL4 mit CD44v10-pcDNA3.1 (+) transfiziert  
 EL4-CD49d EL4 mit CD49d-pcDNA3.1 (+) transfiziert (Dr. V. Singh)  
 EL4-mutCD49d EL4 mit CD49d-S988A-pcDNA3.1 (+) transfiziert (Dr. V. Singh)  
 HEK 293T EBNA American Type Culture Collection  
 HEK-CD44s EL4 mit CD44s-pCEP4 transfiziert  
 HEK-CD44v10 EL4 mit CD44v10-pCEP4 transfiziert

### 2.1.7 Mäuse

C3H/HeJ-Mäuse Jackson Laboratory, Bar Harbour, USA  
 C57Bl/6-Mäuse Charles River, Sulzfeld, Deutschland

### 2.1.8 Peptide

#### 2.1.8.1 MHC I bindende Peptide (Position/ Sequenz)

<b>K31 (Ha1)</b>	222	V E V D A A P P V
147 T E L G L R Q L V	262	T E E L N Q Q V V
211 V E V D A A P T V	168	A D I N G L R R I
157 S D I N G L R R I	<b>K71 (K6irs1)</b>	
251 T E E L N K Q V V	205	S E L R N V R D V
<b>K32 (Ha2)</b>	178	L E P I L E G H I
146 T E L A L R Q L V	193	L E T L S G D R V
156 A D T N G L R R I	242	V D A A Y A N K V
210 I E V D A A P P V	<b>K75 (mK6hf)</b>	
336 Q E Y K V L L D V	465	G E G V S P V N I
<b>K35 (Ha5)</b>	230	Q E V V E D F K V
158 T E V S L R Q L V	197	L E P F F D T Y V

224 AELRNMQEV  
**K82 (Hb2)**  
 430 CEGIGPVNI  
 163 MEPLFEGYI  
 103 LELEIDPTV  
 279 RELDVDGIV

**K85 (Hb5)**  
 168 LEPLFGGYI  
 318 CEEMKATVI  
 435 CEGVGSVNV  
 242 LEANVEALV

### 2.1.8.2 MHC II bindende Peptide (Position/ Sequenz)

**K31 (Ha1)**  
 204 QLGDRLNVEVDAAPT  
 223 RVLNETRCQYEAMVE  
 249 TQTEELNKQVVSSE  
 277 RTVNALEIELQAQHC  
**K32 (Ha2)**  
 203 QLGDRLNIEVDAAPP  
 276 RTVNTLEIELQAQHS  
 86 KIQDVYQGQVLTMCPL  
 350 CEIDTYRGLLESEDS  
**K35 (Ha5)**  
 245 QLGDRLNVEVDAAPP  
 335 DALDSTLAETEGRYS  
 112 LEKVRQLEQENASLE  
 290 TQTEELNQQVVSSE  
**K71 (K6irs)**  
 296 LDLDSIIDEVRAQYE  
 118 VELDPEIQKVRAQER

382 QRGDSALKDARAKLD  
 289 SMDNNRNLDLDSIID  
**K75 (mK6hf)**  
 315 LDLDSIIAEVKAQYE  
 380 SEIDAVKKQCSSLQT  
 239 RYEDDEINKRAAAENE  
 179 ETKWNLLQEQQSRTV  
**K82 (Hb2)**  
 281 LDVDGIVAEIKAQYD  
 181 VSGDHGRLEAELCSL  
 292 AQYDDIASRSKAEAE  
 409 LGLDIEIATYRRLLE  
**K85 (Hb5)**  
 286 LNMDCVVAEIKAQYD  
 243 EANVEALVEESSFLK  
 340 NELNRMIQRLTAEIE  
 282 NSRDLNMDCVVAEIK

### 2.1.9 Puffer und Lösungen

AEC-Komplex Lösung

Lösung1: 2,1ml Essigsäure (0,1M) mit 7,9ml Natriumacetat (0,1M) mischen

Lösung 2: 3,5mg AEC in 500µl Dimethylformamid lösen  
Lösung 1 und Lösung 2 mischen und 5µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) zugeben

AEC-PBS, pH 7,2

137mM NaCl  
1,35mM KCl  
8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Bicarbonatpuffer, pH9,6

15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
35mM NaHCO<sub>3</sub>

Diethanolaminpuffer, pH 9,8

97ml Dietholamin und 100mg MgCl<sub>2</sub> in 1l H<sub>2</sub>O lösen

Elvanol, pH 8,0

20 % (w/v) Mowiol in 2 Teilen PBS und 1 Teil Glycerin lösen

HEPES-Puffer, pH7,4

25mM HEPES  
150mM NaCl  
5mM MgCl<sub>2</sub>  
0,05% NaN<sub>3</sub>

Laemmli-Puffer (6x), pH8,3

350 mM Tris, pH 6,8  
10 % (w/v) SDS  
36 % (w/v) Glyzerin  
0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Lauf-Puffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % (w/v) SDS

Lyse-Puffer

25mM HEPES  
1x Proteaseinhibitor-Cocktail  
1x Phosphataseinhibitor  
1mM PMSF  
1% Detergenz (Triton-X-100 für WB oder Lubrol für IP)

PBG: in PBS gelöst

0,2% (v/v) Fischgelatine  
0,5% (w/v) BSA

PBS, pH7,4

137mM NaCl  
10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2,7mM KCl  
1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Transfer-Puffer

- 50 mM Tris
- 380 mM Glycin
- 0,02 % (w/v) SDS
- 20 % (v/v) Methanol

**2.1.10 Instrumente und Geräte**

Beta-Radioaktivitätszähler Betaplate 1205	LKB Wallace, Piscataway, NJ, USA
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Labotect, Göttingen
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Bioscience, Heidelberg
Elektroporator EasyJect Optima	Peqlab, Erlangen
ELISA-Reader Multiscan FC	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Entwickler Agfa Curix 60	Siemens, Erlangen
Feinwaage RC210D	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Leica DMRBE	Leica, Wetzlar
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Kryotom 2800 Frigocut	Reichert-Jung/Leica, Wetzlar
Magnetrührer MR 3000	Heidolph, Schwabach
Migrationskammer AP48	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, USA
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
pH-Meter PB-11	Sartorius, Göttingen
Photometer Genesys 10uv	Spectronic, Garforth, UK
Photokassette	Amersham, Freiburg
Piptierhilfen Accu-Jet® pro	Brand, Wertheim
Schüttelgerät Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
SDS-PAGE System Mini-PROTEAN	Bio-Rad, München
Sterilarbeitsbank HERAsafe	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ultraschallstab UW 2070	Bandelin, Berlin
Ultra Turrax	IKA Werke, Staufen
Ultrazentrifuge Optima Le-80K	Beckman Coulter, Krefeld
Waage PT 3100	Sartorius, Göttingen



Wasserbad Eco Temp TW8	Julabo, Seelbach
Western Blot System Mini Trans-Blot	Bio-Rad, München
Zählkammer Neubauer improved	Brand, Wertheim
Zellerntegerät Harvester 96	Tomtec Inc., Hamden, CT, USA
Zentrifuge Biofuge 15	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Megafuge 3.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC5B Plus	Kendro, Langenselbold

### 2.1.11 Verbrauchsmaterialien

96-well Mikrotiterplatten, Flachboden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-well Mikrotiterplatten, Rundboden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Beta-Radioaktivitätszähler Filtermatten	LKB Wallace, Piscataway, NJ, USA
Dako Stift	DakoCytomat, Glostrup, Denmark
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen
Gewebekulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Kanülen (20G, 23G, 27G)	BD, Heidelberg
Kryo-Gefäße (2ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Multiwell-Zellkulturplatten (6-well, 24-well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nitrozellulosemembran Hybond ECL	Amersham, Freiburg
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm M	American Nat. Can., Greenwich, GB
Petrischalen (Ø 100mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (20µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß mit Deckel (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß mit Deckel (1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (1ml, 5ml, 10ml, 20ml)	BD, Heidelberg
Spritzenfilter (0,2µm, 0,45µm)	Carl Roth, Karlsruhe
Whatman 3MM paper	Whatman GmbH, Dassel

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zelllinien und -kultur

Die Zelllinie EL4 und die transfizierten EL4-Zelllinien EL4-v10, EL4-CD49d sowie EL4-mutCD49d wachsen in Suspension. Die parentale Zelllinie wurde in RPMI-1640-Medium, versetzt mit 10% FCS, 245,5µg/ml L-Glutamin, 100U/ml Penicillin-G und 100µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Kultur-Medium der transfizierten Zelllinien enthielt zusätzlich 250µg/ml G418. Die Zellen wurden regelmäßig durch 1:4 Verdünnung in neue Zellkulturflaschen mit frischem Kulturmedium passagiert

HEK-293T-EBNA-Zellen wachsen adhärent und wurden in IMEM-Medium versetzt mit 10% FCS, 245,5µg/ml L-Glutamin, 100U/ml Penicillin-G und 100µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Kulturmedium der transfizierten HEK-293T-EBNA-Zellen (HEK-CD44s, HEK-CD44v10) enthielt zusätzlich 500µg/ml Puromycin. Sobald eine 80-95%ige Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS/EDTA für ca. 2- 5 min abgelöst und 1:5 verdünnt in frischem Kulturmedium ausgesät. Das abgenommene Kulturmedium der HEK-CD44s und H-CD44v10 enthielt rekombinantes (r) CD44s bzw. rCD44v10 und wurde bis zur weiteren Aufreinigung des rekombinanten Proteins bei -20°C gelagert. Alle Zellen wurden bei 37°C in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

#### 2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mittels Trypanblaufärbung zur Anfärbung von toten Zellen. Die Zellsuspension wurde 1:2 mit Trypanblaulösung verdünnt und die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Gesamtlebendzellzahl in 1ml Zellsuspension ergibt sich dann aus folgender Gleichung:

$$\text{Lebendzellzahl /ml} = \text{ausgezählte Zellen} \times 2 \times 10^4$$

#### 2.2.1.3 Kryokonservierung lebender Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die abgelösten Zellen durch Zentrifugation (1600rpm, 4min, 4°C) pelletiert, mit PBS gewaschen und in FCS/10% DMSO zu ca.  $1 \times 10^7$  Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C für mindestens 24 Stunden eingefroren. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die gefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen im warmen Wasser-

bad (1min, 37°C) aufgetaut, sofort in 25ml vorgewärmtes Medium gegeben und ohne Abbremsen pelletiert (1600rpm, 4min, 4°C). Die Zellen wurden in Zellkulturmedium resuspendiert, ausgesät und im Brutschrank kultiviert.

#### **2.2.1.4 Transfektion von EL4-Zellen**

Die Klonierung der CD49d-pcDNA3.1 und mutCD49d-pcDNA3.1 sowie die Transfektion der EL4-Zellen mit beiden Plasmidvektoren wurde von Dr. V. Singh durchgeführt. Die Klonierung des CD44v10-pcDNA3.1 wurde von Dr. P. Gupta durchgeführt. Die Transfektion der EL4-Zellen mit CD44v10-pcDNA3.1 erfolgte durch Elektroporation von  $1 \times 10^7$  Zellen, die in 200µl serumfreiem RPMI-Medium resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt wurden. Nach Akklimatisierung bei RT für 10min wurden 15µg Plasmid-DNA hinzugegeben und die Zellen mit 250V, 960µF elektroporiert. Die Zellen wurden in der Küvette für weitere 10min bei RT gehalten und anschließend in 6-well-Platten mit Zellkulturmedium ohne Antibiotika ausgesät. 24h nach der Elektroporation wurden die Zellen in Selektionsmedium mit 250µg/ml G418 überführt und weitere 24h später durchflusszytometrisch auf Transfektionseffizienz untersucht. Für Einzelzellklone wurden transfizierte Zellen in 96-well-Platten zu 1-3 Zellen pro well ausgesät und Zellkolonien auf stabile Transfektion regelmäßig durchflusszytometrisch getestet.

#### **2.2.1.5 Transfektion von HEK-293T-EBNA-Zellen**

Der verwendete pCEP4-Expressionsvektor enthielt ein BM40-Sekretionsignal, so dass exprimierte Proteine in den Kulturüberstand abgegeben wurden. Die Klonierung der rCD44s-pCEP4 und rCD44v10-pCEP4 wurde von Dr. R. Singh und von Dr. P. Gupta durchgeführt.  $6 \times 10^5$  HEK-293T-EBNA-Zellen wurden in komplettem Zellkulturmedium in 6-well-Platten ausgesät, die bis zu einer Konfluenz von 70-80% wuchsen. Für die Transfektion wurden 20µl Polyfect-Reagenz in 100µl serumfreiem IMEM verdünnt und für 5min bei RT äquilibriert. Anschließend wurden 2µg Plasmid-DNA zugefügt, gut durchmischt und für 20min bei RT inkubiert um DNA-Lipid-Komplexe zu bilden. Zwischenzeitlich wurde das Zellkulturmedium der Hek-293T-EBNA-Zellen durch 2ml Zellkulturmedium ohne Antibiotika ersetzt. Die DNA-Lipid-Komplex-Lösung wurde tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben. 24h nach der Transfektion wurde das antibiotikafreie Medium gegen Selektionsmedium mit 500µg/ml Puromycin ausgetauscht. Der Kulturüberstand wurde nach weiteren 48h auf rCD44s und rCD44v10 mittels Western Blot auf Transfektionseffizienz untersucht.

### **2.2.1.6 Generierung von dendritischen Zellen**

Frisch isolierte Knochenmarkszellen (BMC) wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  BMC/ml in 10ml RPMI-1640-Medium, versetzt mit 10% FCS, 245,5µg/ml L-Glutamin, 100U/ml Penicillin-G, 100µg/ml Streptomycin, 2ng/ml rIL4 und 10ng/ml rGM-CSF (DC-Medium) in einer Bakterienkultur-Petrischale ausgesät und bei 37°C in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Weitere 10ml DC-Medium wurden am Tag 3 zugegeben und die Hälfte wurde am Tag 6 durch frisches DC-Medium ersetzt.

### **2.2.1.7 Beladung von dendritischen Zellen mit Peptiden und Hautlysat**

Die Beladung der DC mit Hautlysat erfolgte am Tag 8 der DC-Kultur, der 100µg/ml Hautlysat und 0,5µg/ml LPS für die Reifung der DC zugesetzt wurde. Am Tag 9 wurden die maturierten, Lysat-beladenen DC geerntet.

Für die Beladung mit Peptiden wurden die DC am Tag 8 mit 0,5µg/ml LPS für 24h maturiert. Am Tag 9 wurden  $2,5 \times 10^6$  maturierte DC/ml in serumfreien RPMI-Medium resuspendiert, 10µg/ml Peptid zugegeben und für 3h im Brutschrank inkubiert. Die Peptid-beladenen DC wurden zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen (1600rpm, 4min, 20°C) und in serumfreien RPMI-Medium resuspendiert.

### **2.2.1.8 Adhäsionsassay**

96-F-well-Platten wurden mit Matrixproteinen (2-50µg/ml) in Bicarbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet (16h, 4°C) und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mit PBS/ 2% BSA blockiert (1h, 37°C).  $5 \times 10^4$  Zellen pro Probe wurden unbehandelt oder mit Antikörper (10µg/ml) vorinkubiert (30min, 4°C) ausgesät und für 6h bei 37°C inkubiert. Nicht adhärenente Zellen wurden durch dreimaliges waschen mit PBS ab gespült. Die verbleibenden, adhärenenten Zellen wurden mit Methanol für 10min bei RT fixiert und mit 0,5% Kristallviolett-Lösung (in 10% Ethanol) für 10min bei RT gefärbt. Überschüssige Kristallviolett-Lösung wurde mit Wasser ausgespült und die Platte wurde getrocknet. Der Farbstoff wurde mit 10%iger Essigsäure aus den Zellen gelöst und photometrisch bei 595nm gemessen.

### **2.2.1.9 Transwell-Migrationsassay (Boyden-Kammer)**

Der untere Teil der Boyden-Kammer wurde mit Matrixproteinen (2-50µg/ml) in 50µl serumfreiem Medium beschickt und  $5 \times 10^4$  Zellen pro Probe wurden unbehandelt oder mit Antikörper (10µg/ml) vorinkubiert (30min, 4°C) in 30µl serumfreiem Medium in der oberen Kammer ausgesät. Getrennt wurden beide Kammern durch eine Polycarbonat-Membran mit einer Po-

renggröße von 5µm für lymphatische Zellen (LNC) oder von 8µm für Tumorzellen. Die Boyden-Kammer wurde für 4h (LNC) bzw. 12h (Tumorzellen) bei 37°C inkubiert. Die migrierten Zellen wurden anschließend in einer Neubauer-Kammer ausgezählt.

#### **2.2.1.10 Videomikroskopie**

24-well-Platten wurden mit Matrixproteinen (2-50µg/ml) in 150µl Bicarbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet (16h, 4°C) und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mit PBS/ 2% BSA blockiert (1h, 37°C).  $1 \times 10^4$  Zellen pro Probe wurden unbehandelt oder mit Antikörper (10µg/ml) vorinkubiert (30min, 4°C) ausgesät und die Bewegung der Zellen unter Kulturbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchte) an einem IX81-Inversmikroskop mit angeschlossener CCD-Kamera untersucht. Im Durchlicht-Modus wurden 2 Bilder pro Probe im Abstand von 20min über einen Zeitraum von 12h aufgenommen. Die Zellbewegung wurde mit der Software ImageJ ausgewertet.

#### **2.2.1.11 Proliferationsassay**

LNC ( $2 \times 10^5$ - $2 \times 10^4$ ) wurden im Verhältnis 1:10 mit beladenen DC in 96-U-well-Platten ausgesät und im Brutschrank für 32h bzw. 56h restimuliert. Anschließend wurde radioaktivmarkiertes Thymidin (<sup>3</sup>H-Thymidin, 10µCi/ml), das während der Zellteilung in die DNA eingebaut wurde, dem Kulturmedium zugegeben und die Zellen für weitere 16h im Brutschrank inkubiert.

Tumorzellen ( $5 \times 10^4$  pro Probe) wurden in 96-F-well-Platten, die zum Teil zuvor mit Matrixproteinen (2-50µg/ml) in 50µl Bicarbonatpuffer (pH9,6) beschichtet worden waren (16h, 4°C), ausgesät und im Brutschrank inkubiert (32h bzw. 56h). Die Tumorzellen wurden teilweise mit Antikörper (10µg/ml) vorinkubiert (30min, 4°C) oder cis-Diaminplatinum(II)dichloride (cis-Platin, 5-20µg/ml) wurde dem Kulturmedium zugegeben. Anschließend wurde <sup>3</sup>H-Thymidin (10µCi/ml) dem Kulturmedium hinzugefügt und für weitere 16h inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einem „Erntegerät“ lysiert und die radioaktivmarkierte DNA in Filtermatten aufgefangen. Die Filtermatten wurden getrocknet und mit Szintillationspuffer getränkt. Die enthaltene Radiaktivität wurde als *counts per minute* (cpm) mit einem β-Zähler gemessen.

#### **2.2.1.12 Zellzyklus-Analyse**

Tumorzellen ( $1 \times 10^5$  pro Probe) wurden in 96-F-well-Platten, die zum Teil zuvor mit Matrixproteinen (2-50µg/ml) in 50µl Bicarbonatpuffer (pH9,6) beschichtet worden waren (16h, 4°C), ausgesät und im Brutschrank inkubiert (24h bis 72h). Die Tumorzellen wurden teilweise

mit Antikörper (10µg/ml) vorinkubiert (30min, 4°C). Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen (1600rpm, 4min, 4°C), mit 70%igem Ethanol fixiert (3h, 4°C) und erneut gewaschen. Die Zellen wurden in 100µl Propidiumiodid-Lösung (10µg/ml Propidiumiodid [PI], 100µg/ml RNase A, 1% Triton-X-100 in PBS) resuspendiert und im Dunkeln inkubiert (15min, RT). Die Zellzyklusverteilung wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Fluoreszenzintensität des an die DNA angelagerten PI ist proportional zum DNA-Gehalt in einzelnen Zellen. Die Zellzyklus-Phasen G0/G1 (einfaches DNA-Gehalt), S (intermediär) und G2 (doppeltes DNA-Gehalt) konnten entsprechend unterschieden werden.

#### **2.2.1.13 Bestimmung der Apoptoserate**

Die Zellen ( $1 \times 10^5$  pro Probe) wurden in 96-F-well-Platten, die zum Teil zuvor mit Matrixproteinen (2-50µg/ml) in 50µl Bicarbonatpuffer (pH9,6) beschichtet worden waren (16h, 4°C), ausgesät. Die Zellen wurden teilweise mit Antikörper (10µg/ml) vorinkubiert (30min, 4°C) oder zusammen mit cis-Platin (5-20µg/ml) im Brutschrank inkubiert (24h bis 72h). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (1600rpm, 4min, 4°C) gewaschen und in 50µl Bindungspuffer resuspendiert, der 0,5µl FITC-markiertes AnnexinV pro Probe und 0,08µg/ml PI enthielt. Die Negativkontrolle wurde in Bindungspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden im Dunkeln inkubiert (10min, RT) und die Apoptoserate durchflusszytometrisch analysiert. Lebende Zellen waren sowohl negativ für AnnexinV als auch für PI. Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose sind AnnexinV<sup>+</sup>, aber PI<sup>-</sup> und Zellen in einem späten Stadium bzw. nekrotische Zellen sind AnnexinV<sup>+</sup> und PI<sup>+</sup>.

#### **2.2.1.14 Carboxyfluorescein-diacetatsuccimidinester-Färbung (CFSE)**

Die Tumorzellen wurden mit PBS gewaschen (1600rpm, 4min, 4°C), in serumfreien RPMI-Medium zu  $5 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert und CFSE, ein intrazellulärer kovalent an Proteine bindender Fluoreszenzfarbstoff, wurde zu einer Endkonzentration von 45µM hinzugegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank für 30min inkubiert. Ungebundener Farbstoff wurde mit 1 Volumen FCS geblockt (15min, 4°C). Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und in serumhaltigem RPMI-Medium inkubiert (1h, 37°C). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS resuspendiert.

## 2.2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

### 2.2.2.1 Haltung

Die Mäuse wurden unter *spezifisch pathogenfreien* Bedingungen in der interfakultären biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg und der zentralen Tierhaltungseinrichtung der Universität Marburg gehalten. Die Mäuse wurden mit sterilem Futter und Wasser *ad libitum* gefüttert. Für Experimente wurden Mäuse in einem Alter von 8 bis 10 Wochen eingesetzt.

### 2.2.2.2 Induktion eines Kontaktekzems (*delayed type hypersensitivity reaction, DTH*)

Der Mäuserücken wurde rasiert und etwa 100µl 1% Quadratsäuredibutylester in Aceton (squaric acid dibutylester, SADBE) als Kontaktallergen topikal appliziert. Danach erfolgte eine wöchentliche topikale Applikation mit 100µl 0,5% SADBE bis nach etwa 3 bis 4 Wiederholungen ein Kontaktekzem sichtbar wurde (gerötete, rissige Haut; geschwollene Lymphknoten). Die Mäuse wurden 48h bis 72h nach der letzten Wiederholung durch zervikale Dislokation getötet.

### 2.2.2.3 Injektion von Tumorzellen

Zur Analyse der *in vivo* Migration wurden  $1 \times 10^7$  CFSE-markierte Tumorzellen pro C57Bl/6-Maus intravenös (iv.) injiziert. Zum Teil war in den Mäusen ein Kontaktekzem induziert worden, dann wurden die CFSE-markierten Tumorzellen zusammen mit der letzten SADBE-Behandlung iv. injiziert. Nach 48h bzw. 72h wurden die CFSE-markierten Tumorzellen in den Organen durchflusszytometrisch oder fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

### 2.2.2.4 Hauttransplantation

Eine von *Alopecia totalis* betroffene C3H/HeJ-Spendermaus wurden durch zervikale Dislokation getötet und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Der Spendermaus wurden Hautstücke ( $\varnothing$  1cm) entnommen, die bis zur Transplantation in eiskaltem PBS gelagert wurden. Die C3H/HeJ-Empfängermäuse wurden für die Operation mit 120mg/kg Ketamin und 80mg/kg Xylazin narkotisiert, im oberen Rückenbereich rasiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Operationsstelle wurde mit Iodid desinfiziert und ein Hautstück ( $\varnothing < 1\text{cm}$ ) entfernt. Spenderhaut wurde in der Wunde platziert und mit drei Einzelknopfheftungen angenäht. Die Wunde wurde mit Gewebekleber verschlossen. Anschließend wurden die Empfängermäuse bandagiert und mit dem Antibiotikum Sulfadimidin (1g/l im Trinkwasser) vom Tag der OP (Tag 0) bis Tag 4 und von Tag 7 bis 11 behandelt. AA entwickelt sich in der Regel 8 bis 12 Wochen nach der Hauttransplantation.

#### **2.2.2.5 Autoantigen-spezifische Therapie der Alopecia Areata**

Für den Therapieversuch wurde in C3H/HeJ-Mäusen AA durch Hauttransplantation induziert. Den Empfängertieren wurde wöchentlich entweder ab dem Tag der Operation oder 9 Wochen danach, als deutliche Zeichen der AA-Entwicklung sichtbar wurden, 100µg Peptide in PBS je Maus iv. injiziert. Die Injektionen erfolgten bis 30 Wochen nach der Transplantation.

#### **2.2.2.6 DC-Vakzinierung von C3H/HeJ-Mäusen**

Für die Vakzinierung wurde naiven C3H/HeJ-Mäusen wöchentlich  $2 \times 10^6$  antigenbeladene DC subkutan in den unteren Rückenbereich injiziert.

#### **2.2.2.7 Präparation von Organen für zellbiologische Untersuchungen**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und unter sterilen Bedingungen präpariert. Für die Gewinnung von Lymphozyten (LNC, *lymph node cells*) wurden den Mäusen Lymphknoten und Milz entnommen, die anschließend in PBS auf einer sterilen Gaze zerrieben wurden. Die erhaltene Zellsuspension wurde gewaschen (1600rpm, 4min, 4°C) und in Zellkulturmedium aufgenommen. Für die Isolation von hautinfiltrierenden Lymphozyten (SkIL, *skin infiltrating lymphocytes*) wurde die zuvor rasierte Haut entnommen. Das Unterhautfett sowie Blutgefäße wurden entfernt und die Haut in Trypsin/EDTA inkubiert (30min, 37°C). Die herausgelösten Zellen wurden abgenommen und die Haut in PBS auf einer sterilen Gaze zerrieben. Die erhaltene Zellsuspension wurde gewaschen (2000rpm, 10min) und in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Trypsin/EDTA-Inkubation wurde zweimal wiederholt. Die SkIL wurden zusammengenommen und in Zellkulturmedium inkubiert (2h, 37°C) um die Expression von Oberflächenproteinen zu regenerieren. Für die Gewinnung von Knochenmarkszellen (BMC, *bone marrow cells*) wurden den Mäusen Femur und Tibia entnommen. Das Knochenmark wurde mit PBS mittels einer 27G Kanüle aus dem Knochen gespült, ebenfalls auf einer Gaze zerrieben, gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen.

#### **2.2.2.8 Präparation von Organen für die Immunhistologie**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und unter sterilen Bedingungen präpariert. Die Organe wurden entnommen, auf Pappe aufgelegt und mit Einbettmedium Neg50 überschichtet. Die so präparierten Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

#### **2.2.2.9 Herstellung von Hautlysat Alopecia totalis betroffener Mäuse**

Die rasierte Haut wurde abgenommen und Unterhautfett sowie Blutgefäße entfernt. Die Haut wurde mit einem Skalpell in etwa 0,5cm x 0,5cm große Stücke zerteilt, in 5ml eiskaltem PBS



aufgenommen und mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Das erhaltene Lysat wurde abzentrifugiert (2000rpm, 20min) und bei -20°C gelagert

#### **2.2.2.10 T-Zell-Transfer**

LNC wurden von DC-vakzinierten Mäusen, die eine Alopecia entwickelt hatten, isoliert. Je  $1 \times 10^7$  LNC wurden subkutan im Nackenbereich naiver C3H/HeJ-Mäuse injiziert und bis zur Entwicklung von Haarausfall gehalten.

### **2.2.3 Immunologische Methoden**

#### **2.2.3.1 Durchflusszytometrie**

Für die Markierung von Oberflächenantigenen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Probe in 96-U-well-Platten ausgesät und mit PBS/ 1% BSA gewaschen (1600rpm, 4min, 4°C). Die Zellen wurden mit unmarkiertem oder biotinyliertem Primärantikörper in 40µl PBS/ 1% BSA inkubiert (30min, 4°C), zweimal mit PBS/ 1% BSA gewaschen und anschließend mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper bzw. Streptavidin im Dunkeln inkubiert (30min, 4°C). Nach zweimaligem Waschen mit PBS/ 1% BSA wurden die Zellen in 150µl PBS/ 1% BSA resuspendiert, in FACS-Probenröhrchen überführt und am Durchflusszytometer „FACS Calibur“ gemessen. Als Kontrolle für die spezifische Färbung dienten nur mit Zweitantikörper inkubierte Zellen. Die Lasereinstellungen wurden so gewählt, dass einzelne Zellpopulationen auf Grund ihrer Zellgröße (am Vorwärtsstreulicht determinierbar) sowie –granularität (am Seitwärtsstreulicht determinierbar) voneinander unterscheidbar waren und die Eigenfluoreszenz der Zellen eine mittlere Fluoreszenzintensität von 10-100rfu hatten. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Cell Quest Pro*.

Für die intrazelluläre Markierung wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Probe in 96-U-well-Platten ausgesät und mit PBS/ 1% BSA gewaschen (1600rpm, 4min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen mit PBS/ 1% Formaldehyd fixiert (30min, 4°C), mit PBS/ 1% BSA gewaschen und mit PBS/ 0,5% Tween-20 permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/ 1% BSA erfolgte die Antikörperinkubation wie für die Oberflächenmarkierung beschrieben.

Für die durchflusszytometrische Analyse CFSE-markierter Zellen wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 96-U-well-Platten ausgesät und zweimal mit PBS/ 1% BSA gewaschen, in 150µl PBS/ 1% BSA resuspendiert, in FACS-Probenröhrchen überführt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software *Cell Quest Pro*.

### 2.2.3.2 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Für den Nachweis von Zytokinen aus Kulturüberständen wurden ELISA-Platten (96-well-Format) mit 50µl Fangantikörper (2-5µg/ml) in Bicarbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet (16h, 4°C), dreimal mit PBS gewaschen und freie Bindungsstellen mit PBS/ 2% BSA blockiert (1h, 37°C). Die Platte wurde mit 100µl je Probe Kulturüberstand beladen und inkubiert (16h, 4°C), erneut dreimal mit PBS/ 0,1% Tween-20 gewaschen und mit 50µl biotinyliertem Detektionsantikörper (1-2,5µg/ml) in PBS/ 1% BSA inkubiert (2h, 37°C). Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ 0,1% Tween-20 wurde die Platte mit Alkalische-Phosphatase-markiertem Streptavidin (0,2µg/ml) in PBS/ 1% BSA inkubiert (1h, 37°C). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS/ 0,1% Tween-20 erfolgte die Inkubation mit 50µl Substratlösung im Dunkeln bei 37°C bis zum Farbumschlag nach gelb. Als Substrat dienten p-Nitrophenylphosphat-Tabletten, die in 5ml Dietholaminpuffer (pH9,8) gelöst wurden. Der Substratumsatz wurde photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 405nm gemessen.

Für die Ermittlung von Bindungspartnern von CD44s und CD44v10 wurden ELISA-Platten (96-well-Format) mit Zytokinen (100ng/ml) und Matrixproteinen (2-50µg/ml) in Bicarbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet (16h, 4°C), dreimal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit PBS/ 2% BSA blockiert (1h, 37°C). Die Platte wurde mit 100µl je Probe rekombinanten rCD44s oder rCD44v10 (10-40µg/ml) beladen und inkubiert (16h, 4°C). Die Platte wurde dreimal mit PBS/ 0,1% Tween-20 gewaschen und mit 50µl anti-panCD44 (IM7) (5µg/ml) in PBS/ 1% BSA inkubiert (2h, 37°C). Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ 0,1% Tween-20 wurde die Platte mit biotinyliertem anti-Ratten-Antikörper (1,5µg/ml) in PBS inkubiert (2h, 37°C), dreimal mit PBS/ 0,1% Tween-20 gewaschen und mit Alkalische Phosphatase- Streptavidin (0,2µg/ml) in PBS inkubiert (1h, 37°C). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS/ 0,1% Tween-20 erfolgte die Inkubation mit 50µl Substratlösung im Dunkeln bei 37°C bis zum Farbumschlag nach gelb. Als Substrat dienten p-Nitrophenylphosphat-Tabletten, die in 5ml Dietholaminpuffer (pH9,8) gelöst wurden. Der Substratumsatz wurde photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 405nm gemessen.

### 2.2.3.3 *TRAP-Assay ( T cell recognition of antigen-presenting cells by protein capture)*

Während der Antigenerkennung von T-Zellen auf Antigen präsentierenden Zellen (APC) erfolgt der Austausch von Membranfragmenten (Trogozytose). Durch die Messung der Trogozytoserate können antigenspezifische T-Zellen quantitativ nachgewiesen werden.

Aktivierte DC wurden in PBS in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml resuspendiert und mit 10µg/ml Biotin-n-Hydroxysuccinimidester (Biotin-X-NHS) inkubiert (30min, 37°C). Um ungebundenes Biotin zu blocken, wurde 1 Volumen FCS zu den Zellen gegeben und auf Eis

inkubiert (10min). Die biotinylierten DC wurden dreimal in PBS gewaschen (1600rpm, 4min, 4°C), mit Peptid (10µg/ml) beladen (3h, 37°C) und nochmals gewaschen (1600rpm, 4min, 20°C). In einer 96-U-well-Platte wurden pro Probe  $1 \times 10^5$  Lymphozyten mit  $5 \times 10^5$  DC kokultiviert (2h, 37°C). Um anschließend Zellaggregate aufzulösen, wurden die Zellen einmal mit PBS / 2mM EDTA und zweimal mit PBS gewaschen (4min, 1600rpm, 4°C). Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin sowie anti-CD4- bzw. anti-CD8-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem anti-Ratte-Antikörper gegengefärbt (s. 2.2.3.1) und durchflusszytometrisch analysiert. Antigenspezifische T-Zellen waren doppelpositiv für Biotin (ursprünglich von DC-Zellmembran) und CD4 bzw. CD8.

#### 2.2.3.4 Zytotoxizitätsassay

Um die zytotoxische Aktivität der CTL zu messen, wurde ein JAM-Test durchgeführt. LNC wurden *in vitro* mit Peptid-beladenen DC im Verhältnis 1:10 und IL2 (10U/ml) im Brutschrank restimuliert (5 Tage, 37°C). Als Zielzellen dienten Lymphoblasten. Hierzu wurden naive LNC mit ConA (Mitogen, 10µg/ml) stimuliert (2 Tage, 37°C) und anschließend mit Peptid (10µg, 2h, 37°C) beladen. Die Peptid-beladenen Blasten wurden mit  $^3\text{H}$ -Thymidin (10µCi/ml, 16h, 37°C) markiert. Restimulierte CTL ( $2 \times 10^6 - 5 \times 10^4$ ) wurden in Zellkulturmedium in 96-U-well-Platten ausgesät.  $^3\text{H}$ -Thymidin-markierte Zielzellen ( $1 \times 10^4$ ) wurden zugegeben und die Zellen kokultiviert (6h, 37°C). Durch die zytotoxische Aktivität der CTL werden die Zielzellen abgetötet und deren DNA fragmentiert. Die Zellen wurden mit einem „Erntegerät“ lysiert und die intakte DNA auf Filtermatten aufgefangen. Die Filtermatten wurden getrocknet und mit Optifluor O (Szintillationspuffer) getränkt. Die Radioaktivität wurde mit einem  $\beta$ -Zähler gemessen und ist als *counts per minute* (cpm) angeben. Je höher die zytotoxische Aktivität der CTL ist, desto geringer ist die gemessene Radioaktivität. Die spezifische Zytotoxizität wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Zytotoxizität} = 100\% \times \frac{\text{cpm}(\text{Zielzellen}) - \text{cpm}(\text{Zielzellen} + \text{Effektorzellen})}{\text{cpm}(\text{Zielzellen})}$$

#### 2.2.3.5 Immunhistologie

Zur immunhistologischen Untersuchung wurden 5-7µm dicke Schnitte von schockgefrorenen Organen auf poly-L-Lysin beschichtete Objektträger gebracht, in Aceton-Chloroform (1:1) fixiert (4min, RT) und über Nacht getrocknet. Für eine intrazelluläre Färbung wurden die Schnitte zusätzlich AEC/ 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert (4min, RT). Die Schnitte wurden mit AEC/ 2% BSA geblockt (30min, 37°C) und die endogene alkalische Phosphatase-Aktivität mit Levamisol-Lösung inhibiert. Die Schnitte wurden mit Primärantikörper (5-

25µg/ml) in AEC/ 1% BSA inkubiert (16h, 4°C), dreimal mit AEC/ 1% BSA gewaschen und mit biotinyliertem Zweitantikörper (1,5µg/ml) inkubiert (2h, 37°C). Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit AEC/ 1% BSA, erfolgte die Färbung mit dem VECTASTAIN ABC KIT. Je ein Tropfen der VECTASTAIN-Lösung A (Avidin) und B (biotinylierte Peroxidase) wurden in 10ml AEC verdünnt und auf Eis inkubiert (30min). Die Schnitte wurden mit dem so entstandenen Avidin-Peroxidase-Komplex inkubiert (30min, 37°C) und erneut mit AEC/ 1% BSA gewaschen. Als Substrat für die Peroxidase diente 3-Amino-9-ethylcarbazol. 3,5mg 3-Amino-9-ethylcarbazol wurden in 500µl Dimethylformamid gelöst, 1:20 in Acetatpuffer verdünnt, filtriert und mit 5µl Wasserstoffperoxid (30%) versetzt. Die Schnitte wurden mit der Substratlösung inkubiert (5-20min, RT), mit AEC/ 1% BSA gewaschen und über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt (1min, RT), mit Wasser gewaschen, erneut getrocknet und in Kaisers Glyceringelatine mit Deckgläschen eingedeckt. Die Schnitte wurden mit einem Leica DMRBE Mikroskop und der Software *Spot 4* analysiert.

### **2.2.3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie**

$5 \times 10^4$  Zellen wurden auf poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesät. Nach deren Adhäsion wurden die Zellen mit PBS/ 4% Paraformaldehyd fixiert (30min, 4°C) und mit PBS/ 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert (4min, 4°C). Die Zellen wurden mit PBS/ 0,2% Fischgelatine/ 0,5% BSA geblockt (1h, RT) und mit Primärantikörper inkubiert (1h, 4°C). Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ 0,2% Gelatine/ 0,5% BSA wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper inkubiert (1h, 4°C). Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS/ 0,2% Gelatine/ 0,5% BSA gewaschen und getrocknet. Die Deckgläschen wurden auf Objektträger in Elvanol eingedeckt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Carl Zeiss Konfokalmikroskop LSM710 und die Software *Axiocview Rel. 4.6* analysiert.

## **2.2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.4.1 Zellyse und Proteinbestimmung nach Bradford**

$1 \times 10^6$  (für Proteinnachweis) bzw.  $1 \times 10^7$  (für Immunpräzipitation, Dichtegradientenzentrifugation) Zellen wurden mit 500-1000µl Lysepuffer lysiert (1h, 4°C) und das Lysat abzentrifugiert (13.000rpm, 10min, 4°C). Die Proteinmenge wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. 1µl des Lysats wurde mit 100µl 1xBradford-Reagenz verdünnt und die Absorption photometrisch bei 595nm gemessen. Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte an Hand einer BSA-Standardkurve definierter Konzentrationen (0-7,5mg/ml).

#### 2.2.4.2 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Herstellung eines diskontinuierlichen Dichtegradientens wurde 80%, 30% und 5% (w/v) Sucrose in Hepes-Puffer gelöst. 800µl 80%ige Sucroslösung wurde 1:1 mit Zelllysate gemischt, in 4ml-Ultrazentrifugationsröhrchen vorgelegt, mit 1,6ml einer 30%igen und mit 800µl einer 5%igen Sucroslösung überschichtet. Die 4ml-Ultrazentrifugationsröhrchen wurden in einem Schwingrotor SW41Ti gehängt und zentrifugiert (100.000g, 16h, 4°C). Anschließend wurden 12 Fraktionen zu je 320µl abgenommen, die z.T. vereinigt wurden. Die Fraktionen wurden bis zur Verwendung in der SDS-PAGE/ Western Blot bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4.3 Immunpräzipitation (IP)

Das Zelllysate wurde mit 2µg/ml Antikörper inkubiert (16h, 4°C) und anschließend mit 5% (v/v) Protein-G-Sepharose erneut inkubiert (1h, 4°C). Die Sepharose wurde dreimal mit Lysepuffer gewaschen (13000rpm, 2min, 4°C), in 100µl Laemmli-Puffer aufgenommen und aufgekocht (10min, 95°C). Die IP wurde bis zur Verwendung in der SDS-PAGE/ Western Blot bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch die Wanderung im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Korrelation des Molekulargewichts zur Ladung und die Maskierung der Eigenladung erfolgten durch negativ geladenes SDS, das sich an die Proteine anlagerte. Die Fokussierung der Proteine erfolgte in einem großporigen Sammelgel und die anschließende Auftrennung in einem 10%igen Trenngel.

##### Trenngel (10%ig, 10ml)

dest. H <sub>2</sub> O	4,0 ml
1,5M TRIS-HCl (pH8,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
Bis-Acrylamid (30%)	3,35ml
10% Ammoniumpersulfat	0,05ml
TEMED	0,005ml

##### Sammelgel (4%ig, 5ml)

dest. H <sub>2</sub> O	2,98 ml
0,5M TRIS-HCl (pH6,8)	1,25 ml
10% SDS	0,05 ml
Bis-Acrylamid (30%)	0,665ml
10% Ammoniumpersulfat	0,05ml
TEMED	0,005ml

Das Trenngel wurde in die Gelapparatur gegossen und mit dest. Wasser überschichtet, das nach der Polymerisierung wieder abgesaugt wurde. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingefügt, der nach der Polymerisierung entfernt wurde. Die Gelapparatur wurde in die Elektrophoresekammer gespannt und mit Laufpuffer gefüllt. Für den Proteinnachweis wurden 30µg Protein und von jeder Fraktion der Dichtegradientenzentrifugation wurden 35µl mit Laemmlipuffer versetzt. Von der IP wurden 25µl verwendet. Die Proben wurden aufgekocht (95°C, 5min), zentrifugiert (2000rpm, 1min) und auf das Gel aufgetragen. Ein Proteingrößenmarker wurde ebenfalls geladen. Die Fokussierung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 60V. Die Spannung wurde für die Auftrennung auf 120V erhöht.

#### **2.2.4.5 Western-Blot**

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das Polyacrylamidgel, die Membran sowie Filterpapier wurden in Transferpuffer äquilibriert (10min, RT) und der Blot aus mehreren Schichten Filterpapier, der Membran, dem Gel und wieder Filterpapier aufgebaut. Der Blot wurde in die Tankblotkammer gespannt, so dass die Nitrozellulosemembran auf die Anode gerichtet war, und mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 30V (16h, 4°C). Die Membran wurde mit 5% Magermilch in PBS/ 0,1% Tween-20 geblockt (1h, RT) und mit Primärantikörper (1-5µg/ml) in 5% Magermilch in PBS/ 0,1% Tween-20 oder für den Nachweis phosphorylierter Proteine in PBS/ 0,1% Tween-20 inkubiert (16h, 4°C). Die Membran wurde dreimal für je 5min mit PBS/ 0,1% Tween-20 gewaschen und mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert (2h, RT). Die Membran wurde dreimal mit PBS/ 0,1% Tween-20 für je 10min gewaschen und mit Substrat inkubiert (1min, RT). Als Substrat diente ECL-Lösung, die zu gleichen Teilen aus Reagenz A und B bestand. Bei dem Substratumsatz wird Chemilumineszenz freigesetzt, die einen Röntgenfilm belichtete.

#### **2.2.4.6 Isolierung von rekombinantem Protein aus Zellkulturüberstand**

Rekombinantes CD44s (rCD44s) und CD44v10 (rCD44v10) wurden über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der Zellkulturüberstand von transfizierten HEK-293T-EBNA-Zellen wurde zentrifugiert (300rpm, 20min, 4°C) und durch einen 0,45µm Filter gefiltert. Eine mit anti-panCD44 gekoppelte Sepharose-Säule wurde mit dem Überstand beladen (16h, 4°C). Die Säule wurde mit Phosphatpuffer (1,5ml/min) gewaschen und das rekombinante Protein mit Glycinpuffer (pH2,7) eluiert (1ml/min). Das Eluat wurde mit TRIS-Puffer (1M, pH8) neutralisiert, mit „Vivaspin 6 column“ zehnfach aufkonzentriert (Molekulargewichtsgrenze des Fil-

ters: 10 kDa) und gegen PBS umgepuffert. Die Proteinmenge wurde bestimmt und das rekombinante Protein bei -20°C gelagert.

#### **2.2.4.7 Herstellung von Peptiden**

Die Peptide wurden aus den Aminosäuresequenzen der ausgewählten Keratine K31, K32, K35, K71, K75, K82 und K85 über das Software-Programm „SYFPEITHI“ ermittelt. „SYFPEITHI“ berechnet Peptidsequenzen und bewertet diese unter Berücksichtigung des Entstehens durch proteasomalen Abbau und der Bindungsaffinität zu MHC Klasse I (H2-K<sup>k</sup>, 9aa lange Peptide) bzw. MHC Klasse II (H2-A<sup>k</sup>, 15aa lange Peptide). Der SYFPEITHI-Wert gibt an, wie wahrscheinlich das Peptid einem *in vivo* prozessierten Antigen entspricht. Für jede MHC-Klasse wurden pro Keratin die vier Peptide mit den höchsten SYFPEITHI-Werten in der DKFZ core facility „Genomics & Proteomics“ synthetisiert.

#### **2.2.5 Statistik**

Signifikante Unterschiede in *in vitro* Assays wurden mit dem Student's t-Test evaluiert. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und 3-5x wiederholt.

Signifikante Unterschiede in *in vivo* Studien wurden mit dem Wilcoxon-Ranksummen-Test oder mit Kruskal-Wallis Test evaluiert. Die *in vivo* Experimente wurden mit 5-10 Mäusen je Gruppe 2-3x wiederholt.

### 3 Ergebnisse

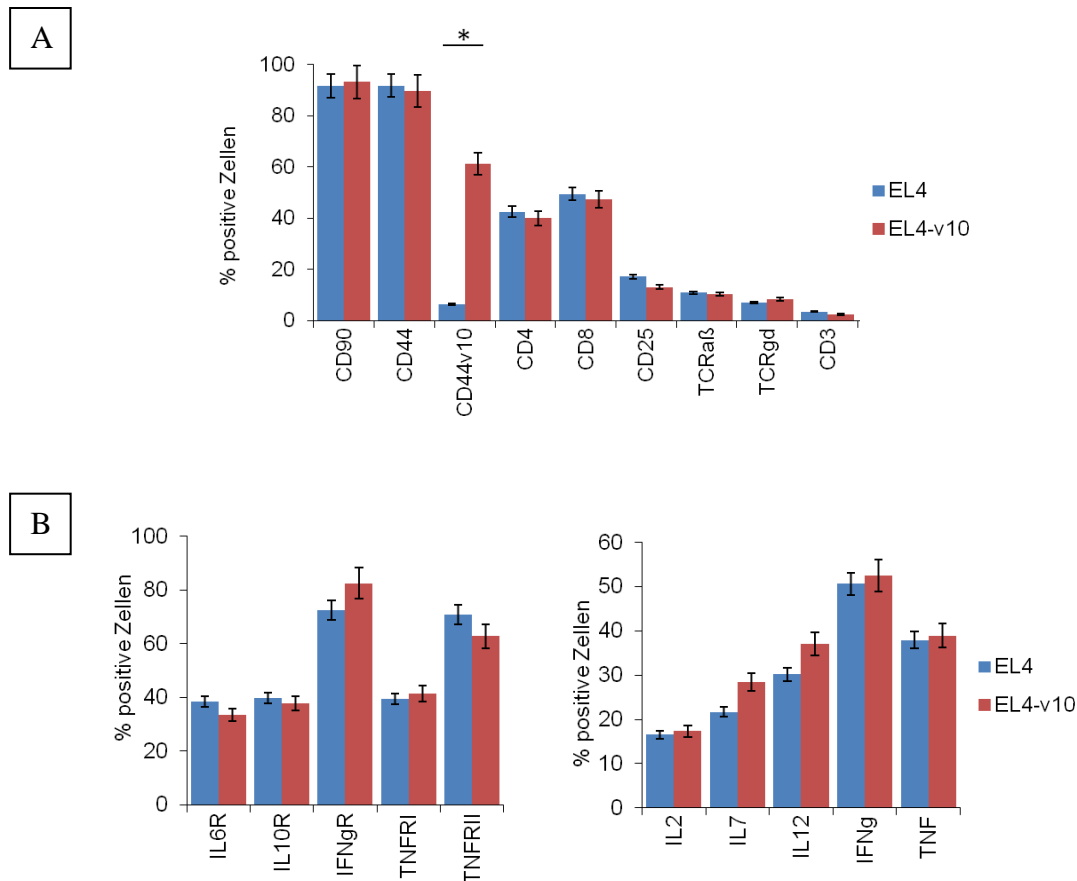
#### 3.1 **CD44v10 Expression fördert das Homing von Lymphozyten in die Haut durch Osteopontin-Bindung**

CD44 ist der wichtigste Hyaluronsäurerezeptor in Säugetieren und die verschiedenen Isoformen sind an Adhäsion, Migration, Extravasation, Proliferation und Apoptoseresistenz von Lymphozyten beteiligt (Zöller 2011). CD44v10 ist hochreguliert in hautinfiltrierenden Lymphozyten und auch in Tumormetastasen der Haut (Seiter et al. 1998; Yoshinari et al. 1999). Im Mausmodell kann der Krankheitsbeginn nach Transplantation betroffener AA-Haut auf naive Empfänger durch die Gabe von sowohl anti-panCD44-Antikörper als auch anti-CD44v10-Antikörper signifikant verzögert werden (Freyschmidt-Paul et al. 2000). Um den zu Grunde liegenden Mechanismus und die CD44v10-spezifischen Funktionen beim *Homing* in die Haut zu analysieren, wurde die Thymomzelllinie EL4, die konstitutiv CD44s exprimiert, mit CD44v10-cDNA transfiziert (EL4-v10). Dieses System erlaubt den Vergleich von CD44v10-spezifischen Funktionen im Vergleich zu CD44s-Effekten.

##### 3.1.1 **Oberflächenproteine und intrazelluläre Moleküle**

In den parentalen und transfizierten Zellen wurde das Expressionsniveau wichtiger Oberflächenproteine durchflusszytometrisch bestimmt, um sekundäre Effekte, die durch Expressionsänderungen anderer Proteine verursacht würden, auszuschließen. Durch die Transfektion mit CD44v10 cDNA in EL4-Zellen konnte eine Expression von CD44v10 in etwa 60% der Zellen erreicht werden. Beide Zelllinien exprimierten gleichermaßen CD44s und CD90 (Thy-1, Thymozytenmarker) in circa 90% der Zellen. EL4 und EL4-v10 zeigten ein mittleres Expressionsniveau für die T-Zell-Marker CD4, CD8 und CD25. Sie exprimierten weder den T-Zell-Rezeptor (TCR) noch CD3. Die exprimierten Oberflächenmoleküle bestätigen den thymomischen Ursprung der Zelllinien. In der Expression der Zytokine und Zytokinrezeptoren wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien festgestellt. Die Zytokine IL2, IL7, IL12 und TNF $\alpha$  wurden schwach exprimiert, hingegen zeigten IFN $\gamma$  und der IFN $\gamma$ -Rezeptor und der TNF-Rezeptor II ein hohes Expressionniveau (Abbildung 11).

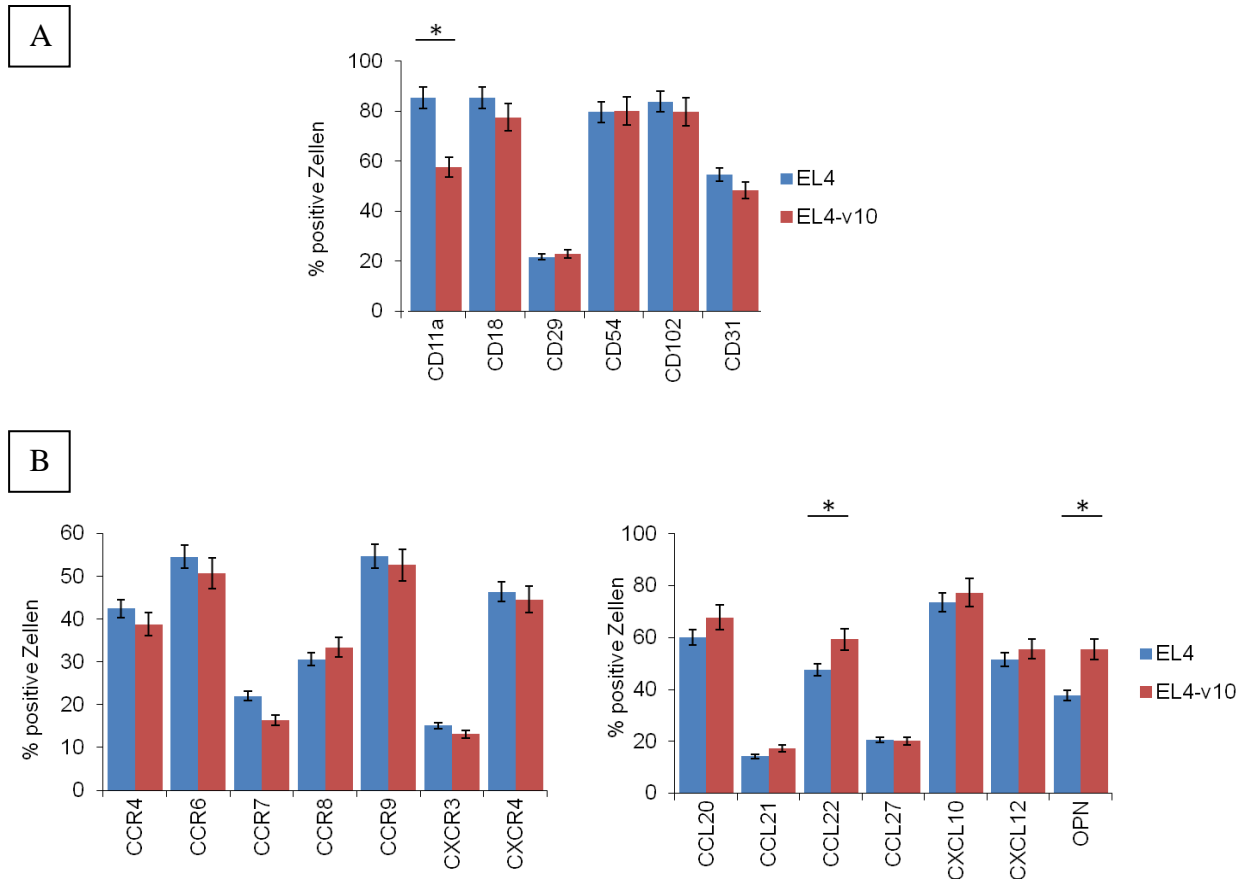




**Abbildung 11: Expression von T-Zell-Markern und Zytokinen sowie Zytokinrezeptoren in EL4-Zellen und EL4-v10-Zellen**

Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver EL4- und EL4-v10 Zellen, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit spezifischen Antikörpern gegen (A) T-Zell-Marker, (B) Zytokinrezeptoren und Zytokine und Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen EL4- und EL4-v10-Zellen sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Für Zellmigration entscheidend ist die Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren. EL4-v10 exprimiert nur in etwa 60% der Zellen CD11a (Integrin  $\alpha 1$ ), während EL4 eine höhere Expression (80%) zeigt. Beiden Zelllinien exprimierten CD18 (Integrin  $\beta 2$ ), CD54 (*Intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1), CD102 (ICAM-2) und CD31 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM) sowie die Chemokinrezeptoren CCR4, CCR6, CCR9 und CXCR4 gleichstark. Die Chemokine CCL20 (*Macrophage Inflammatory Protein-3 $\alpha$* , MIP3 $\alpha$ ), CCL22 (*Macrophage Derived Chemokine*, MDC), CXCL10 (*Interferon  $\gamma$  inducible Protein-10*, IP10), CXCL12 (*Stroma Derived Factor 1 $\alpha$* , SDF1 $\alpha$ ) und Osteopontin (OPN) wurden sowohl von EL4 als auch von EL4-v10 exprimiert, wobei EL4-v10 CCL22 und OPN stärker exprimiert als EL4 (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen sowie Chemokinrezeptoren in EL4-Zellen und EL4-v10-Zellen**

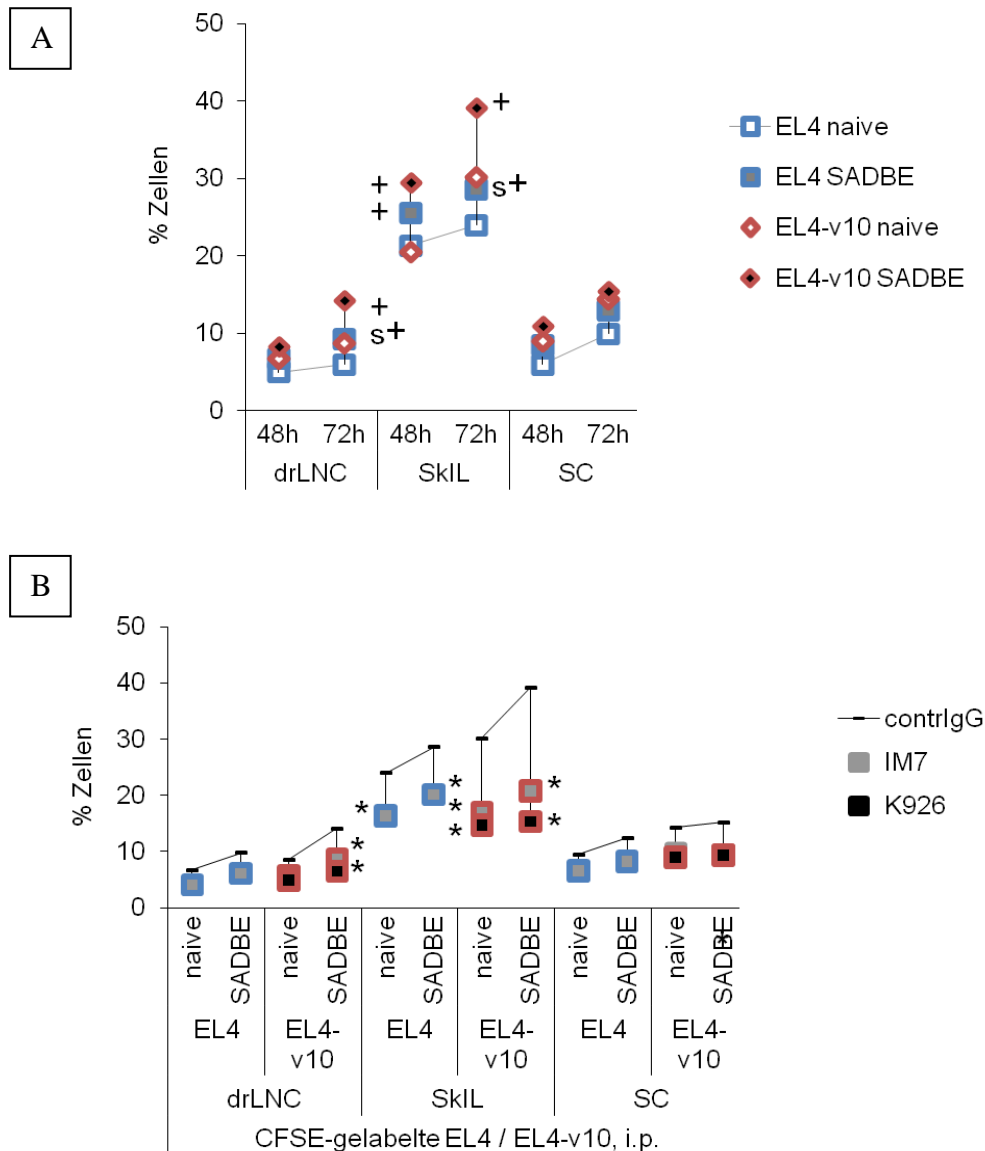
Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver EL4- und EL4-v10 Zellen, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit spezifischen Antikörpern gegen (A) Adhäsionsmoleküle, (B) Chemokinrezeptoren und Chemokine und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. Signifikante Unterschiede zwischen EL4- und EL4-v10-Zellen sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Mit der Transfektion der EL4-Zellen mit CD44v10-cDNA konnte eine hohe Expression von CD44v10 in dieser Zelllinie erreicht werden, wodurch sich das Expressionsniveau von anderen Proteinen nicht bzw. nicht wesentlich änderte, so dass funktionelle Unterschiede zwischen EL4 und EL4-v10 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf CD44v10 zurückzuführen waren.

### 3.1.2 Einfluss von CD44v10 auf *in vivo* Homing

Hautinfiltrierenden Lymphozyten exprimieren CD44v10 und das *Homing* wird durch die Gabe von anti-CD44v10-Antikörper effizient inhibiert. Um den Einfluss von CD44v10 auf das *Homing* in die Haut von EL4- und EL4-v10-Zellen zu zeigen, wurden diese Zellen mit CFSE-gelabelt, intraperitoneal injiziert und nach 48h bzw. 72h in der Haut, den dränierenden Lymphknoten und der Milz durchflusszytometrisch nachgewiesen. Nach 72h migrierten 10% mehr EL4-v10-Zellen in die Haut (*Skin infiltrating lymphocyte*, SkIL) und die dränierenden Lymphknoten als EL4-Zellen. Ein induziertes Kontaktekzem, wodurch ein inflammatorisches

Milieu in der Haut erzeugt wurde, verstärkte die Infiltration beider Zelllinien in die Haut und die dränierenden Lymphknoten, aber EL4-v10 wurde stärker als EL4 beeinflusst. Die gleichzeitige Applikation von anti-panCD44 inhibierte die Extravasation in die Haut und die dränierenden Lymphknoten um circa 30% für EL4 und circa 50% für EL4-v10, anti-CD44v10 inhibierte die Extravasation von EL4-v10-Zellen stärker als anti-panCD44v10. Das *Homing* in die Milz wurde weder durch CD44v10-Expression noch durch ein inflammatorisches Milieu beeinflusst (Abbildung 13).



**Abbildung 13: *in vivo* Homing von EL4 und EL4-v10**

$10^7$  CFSE-gelabelte EL4- und EL4-v10-Zellen wurden C57Bl/6-Mäusen i.p. injiziert. (A) Die Mäuse erhielten zuvor eine topikale SADBE-Behandlung. (B) Anti-panCD44 bzw. anti-CD44v10 (100µg/Maus, i.p.) wurde zusammen mit den Zellen injiziert. Die Organe von 3 Mäusen/Gruppe wurden nach 48h bzw. 72h isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Signifikante Unterschiede zwischen EL4 und EL4-v10 sind mit s gekennzeichnet, zwischen unbehandelten und SADBE-behandelten Mäusen mit +. (B) Signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und antikörper-

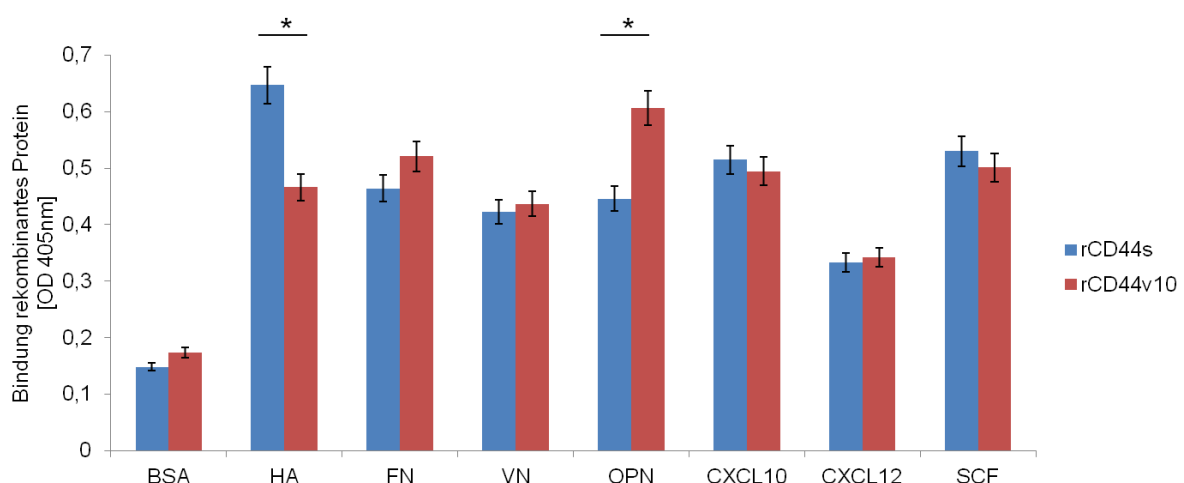
behandelten Mäusen sind mit \* gekennzeichnet. Der Anteil fluoreszierender EL4-/EL4-v10-Zellen in den Organen und Standardabweichungen sind gezeigt.

CD44v10 unterstützte die Extravasation in die Haut und die Migration in dränierende Lymphknoten, was durch ein inflammatorisches Milieu noch verstärkt werden konnte. Die Migration der EL4-v10-Zellen konnte mittels anti-CD44v10 signifikant inhibiert werden. Der gezeigte Effekt ähnelt den *in vivo* Ergebnissen von P. (Freyschmidt-Paul et al. 2000), daher konnte das EL4-Modell für weitere Untersuchungen genutzt werden.

### 3.1.3 Der Einfluss von CD44v10 auf *in vitro* Migration und Adhäsion

Die Extravasation durch das Endothel an den Entzündungsort erfordert die Bindung der Lymphozyten an das Endothel bzw. dessen extrazelluläre Matrix, die aus HA, Fibronectin (FN), Vitronectin (VN), Kollagenen (Coll) und Laminin aufgebaut ist und Chemokine vorhält. Anschließend erfolgt die Transmigration an den Entzündungsort. Um die Beteiligung der Isoform CD44v10 an der verstärkten Migration in die Haut aufzuklären, wurde Adhäsion und Migration der EL4- und EL4-v10-Zellen *in vitro* analysiert.

Die Bindungsfähigkeit von CD44s und CD44v10 an Matrixproteine und Chemokine wurde mittels rekombinanten Proteins untersucht. Beide rekombinanten Proteine rCD44s und rCD44v10 banden jeweils gleichstark an FN, VN und die Chemokine CXCL10, CXCL12 und SCF (*stem cell factor*). HA wurde von rCD44v10 um circa 30% schwächer gebunden als von rCD44s, hingegen wurde OPN von rCD44v10 25% stärker gebunden (Abbildung 14).

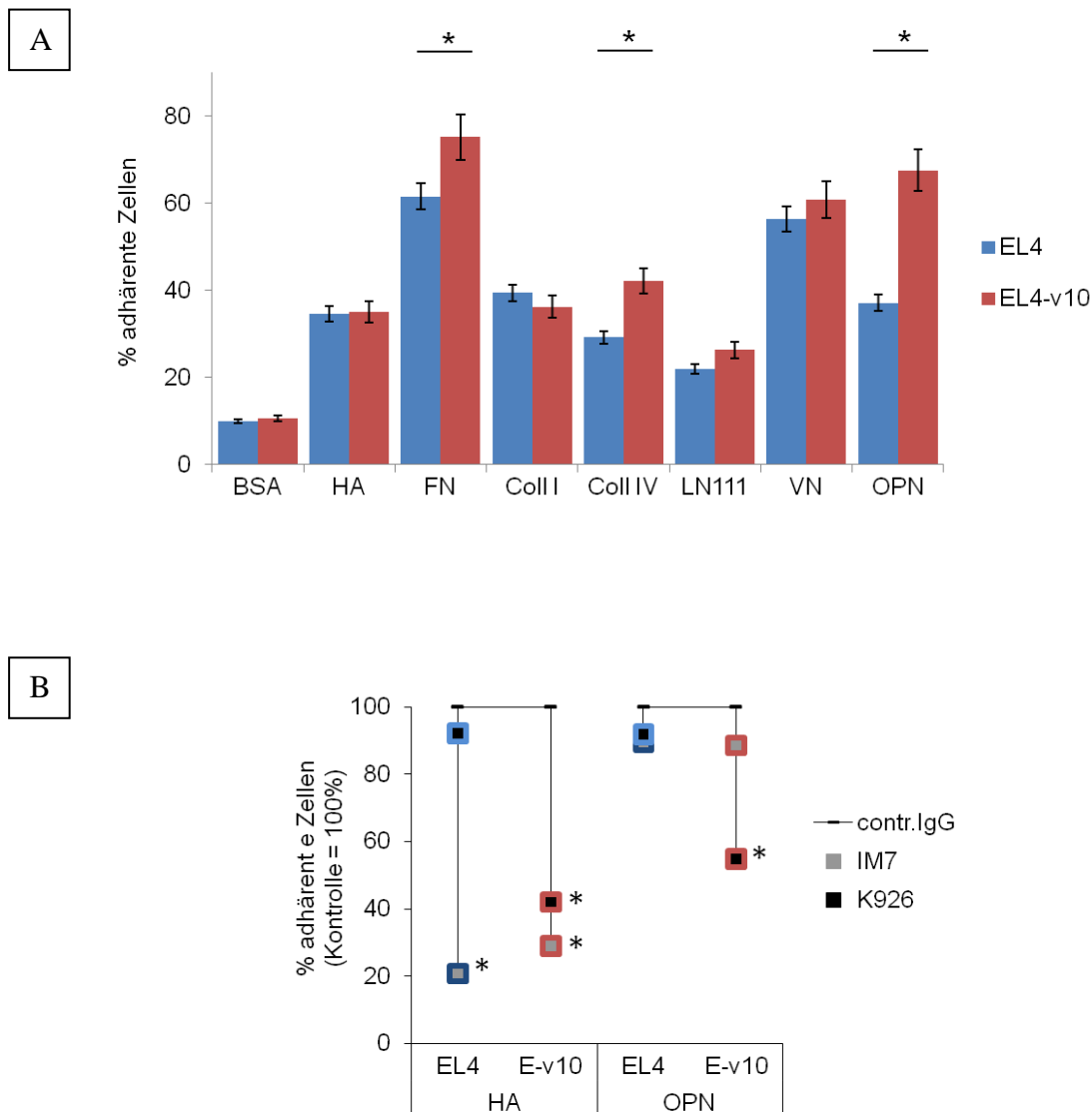


**Abbildung 14: Bindung der rekombinanten Proteine rCD44s und rCD44v10 an Matrixproteine und Chemokine**

40µg/ml rCD44s oder rCD44v10 wurden auf 96-well-Platten, die zuvor mit BSA, HA, FN, VN, OPN, CXCL10, CXCL12 bzw. SCF beschichtet wurden, 15h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden rCD44s bzw. rCD44v10 mit biotinyliertem anti-

panCD44-Antikörper und AP-markiertem Streptavidin angefärbt. Nach p-Nitrophenylphosphat-Umsatz wurden die Platten bei OD<sub>405</sub> gemessen. Signifikante Unterschiede zwischen rCD44s und rCD44v10 sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

EL4-v10 zeigte eine deutlich stärkere Adhäsion als EL4 an OPN, hierbei adhärten circa 40% mehr EL4-v10-Zellen. Je 10% mehr EL4-v10-Zellen adhärten an FN und Coll IV. Beide Zelllinien adhärten gleichstark an HA, VN, Coll I und Laminin1. Die HA-Adhäsion konnte sowohl mit anti-panCD44 als auch mit anti-CD44v10 um 70% bzw. 60% inhibiert werden, während die OPN-Adhäsion von EL4-v10-Zellen nur mittels anti-CD44v10 um die Hälfte reduziert wurde (Abbildung 15).



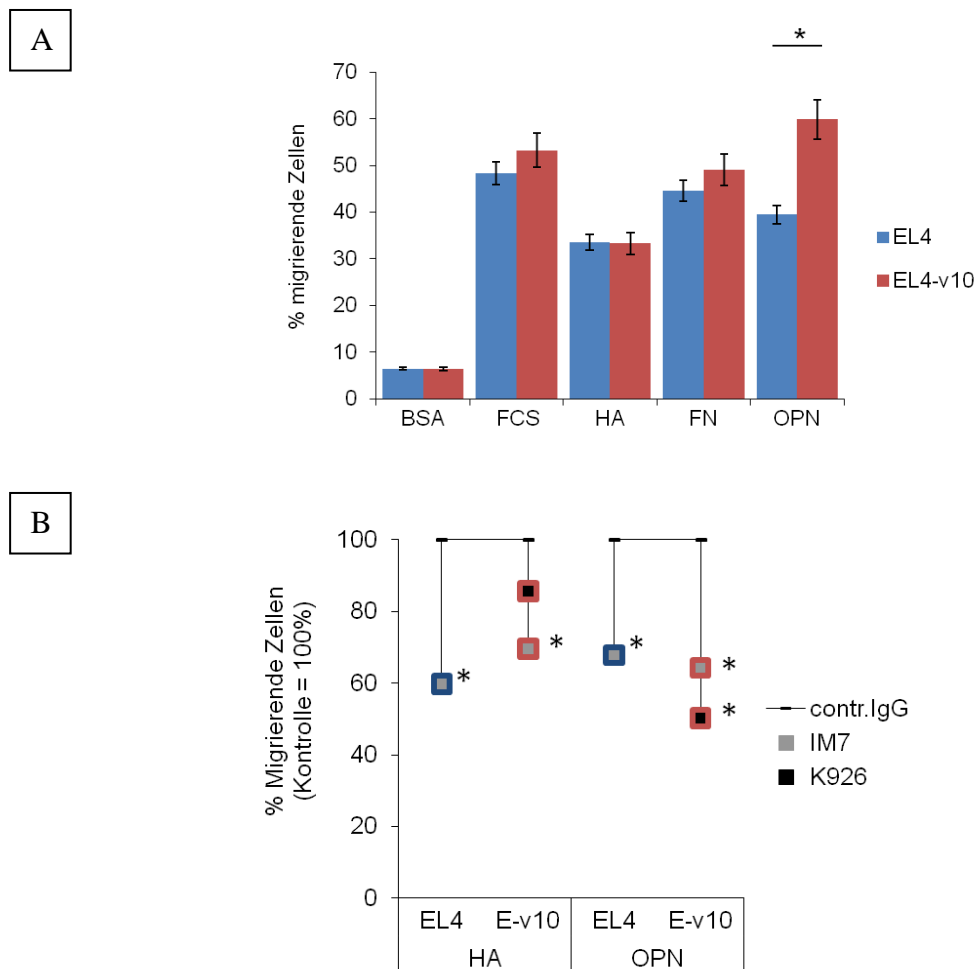
**Abbildung 15: Adhäsion von EL4 und EL4-v10 *in vitro***

(A) Die Zellen wurden in 96-well-Platten, die zuvor mit BSA, HA, FN, Coll. I, Coll. IV, LN111, VN bzw. OPN beschichtet wurden, ausgesät. (B) Die Zellen wurden in 96-well-

Platten, die zuvor mit BSA, HA bzw. OPN beschichtet wurden, mit je 10 µg/ml anti-panCD44 (IM7) oder anti-CD44v10 (K926) ausgesät. Nach 6h bei 37°C wurden die Platten gewaschen und die adhärennten Zellen mit Kristallviolett angefärbt, mit Essigsäure lysiert und bei OD<sub>595</sub> gemessen. (A) Signifikante Unterschiede zu EL4 sind durch \* gekennzeichnet. (B) Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle (ContrIgG) und Antikörperbehandlung sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Das Migrationsverhalten der Zellen wurde sowohl mit Transwell-Migration (Boyden-Kammer) als auch mittels Videomikroskopie untersucht.

60% der EL4-v10-Zellen wanderten in Richtung OPN im Transwell-Migrationsassay, aber nur 40% EL4-Zellen. Die Migration zu HA und FN wurde durch die CD44v10-Expression nicht beeinflusst. Die Migration zu HA konnte mit anti-panCD44 in beiden Zelllinien um circa 30% inhibiert werden. Anti-CD44v10 inhibierte die Migration in Richtung HA leicht, aber nicht signifikant. Die Migration zu OPN jedoch wurde von anti-CD44v10 stärker als anti-panCD44 in EL4-v10-Zellen geblockt (Abbildung 16).



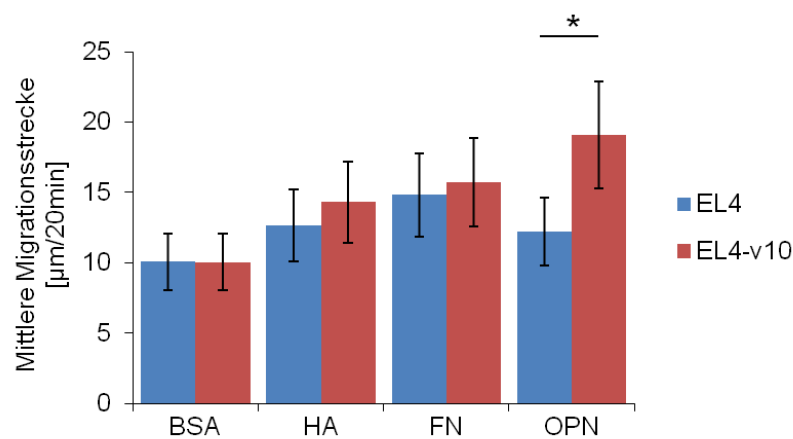
**Abbildung 16: Transwell-Migration von EL4 und EL4-v10 *in vitro***

(A) Die Zellen wurden im oberen Teil einer Boyden-Kammer ausgesät. Im unteren Teil befand sich Medium/1% BSA, HA, FN bzw. OPN. Nach 6h bei 37°C wurden die Zellen

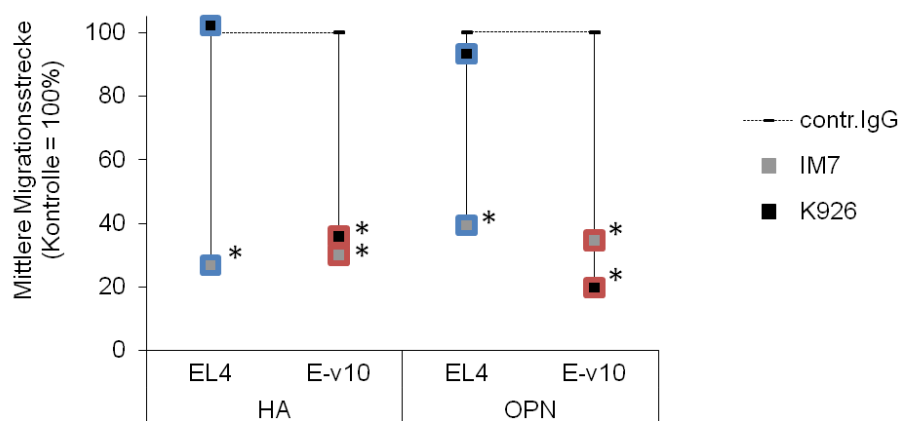
in der unteren Kammer gezählt. (B) Die Zellen wurden im oberen Teil einer Boyden-Kammer mit je 10 µg/ml anti-panCD44 (IM7) oder anti-CD44v10 (K926) ausgesät. (A) Signifikante Unterschiede zwischen EL4 und EL4-v10 sind durch \* gekennzeichnet. (B) Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle (ContrIgG) und Antikörperbehandlung sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

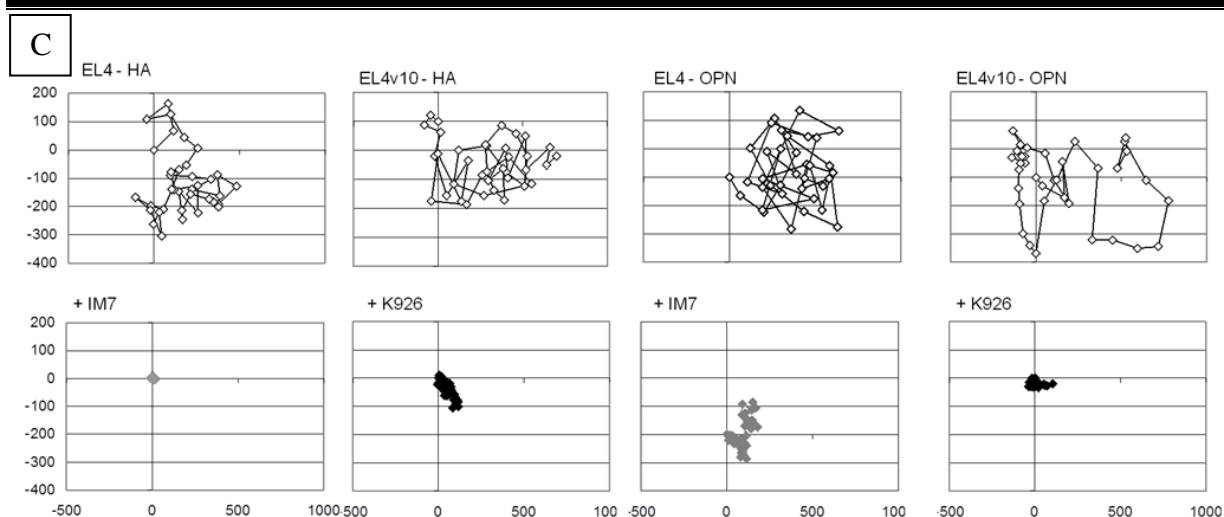
Die Bewegung der Zellen auf Matrixproteinen wurde mittels Videomikroskopie untersucht und zeigte, dass EL4-v10-Zellen signifikant schneller auf OPN wanderten als EL4-Zellen. Auf HA und FN konnte kein Unterschied in der Bewegung festgestellt werden. Die Vorwärtsbewegung auf HA und OPN konnte durch anti-panCD44 in beiden Zelllinien um circa 70% reduziert werden. Anti-CD44v10 inhibierte die Bewegung der EL4-v10-Zellen ähnlich stark wie anti-panCD44 (Abbildung 17).

A



B





**Abbildung 17: Bewegung von EL4- und EL4-v10-Zellen auf Matrixproteinen**

EL4- und EL4-v10-Zellen wurden in 24-well-Platten, die zuvor mit BSA, HA, FN bzw. OPN beschichtet wurden, ausgesät. Die Bewegung wurde mittels Videomikroskopie untersucht, indem über einen Zeitraum von 12h alle 20min Bilder aufgenommen wurden. (A) Durchschnittliche Bewegung von je 20 Zellen und Standardabweichungen sind gezeigt. (B) Die Zellen wurden zusätzlich mit je 10  $\mu\text{g/ml}$  anti-panCD44 (IM7) oder anti-CD44v10 (K926) ausgesät. (C) repräsentative Bewegung einer Zelle über einen Zeitraum von 12h. (A) Signifikante Unterschiede zwischen EL4 und EL4-v10 sind durch \* gekennzeichnet. (B) Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle (ContrIgG) und Antikörperbehandlung sind durch \* gekennzeichnet.

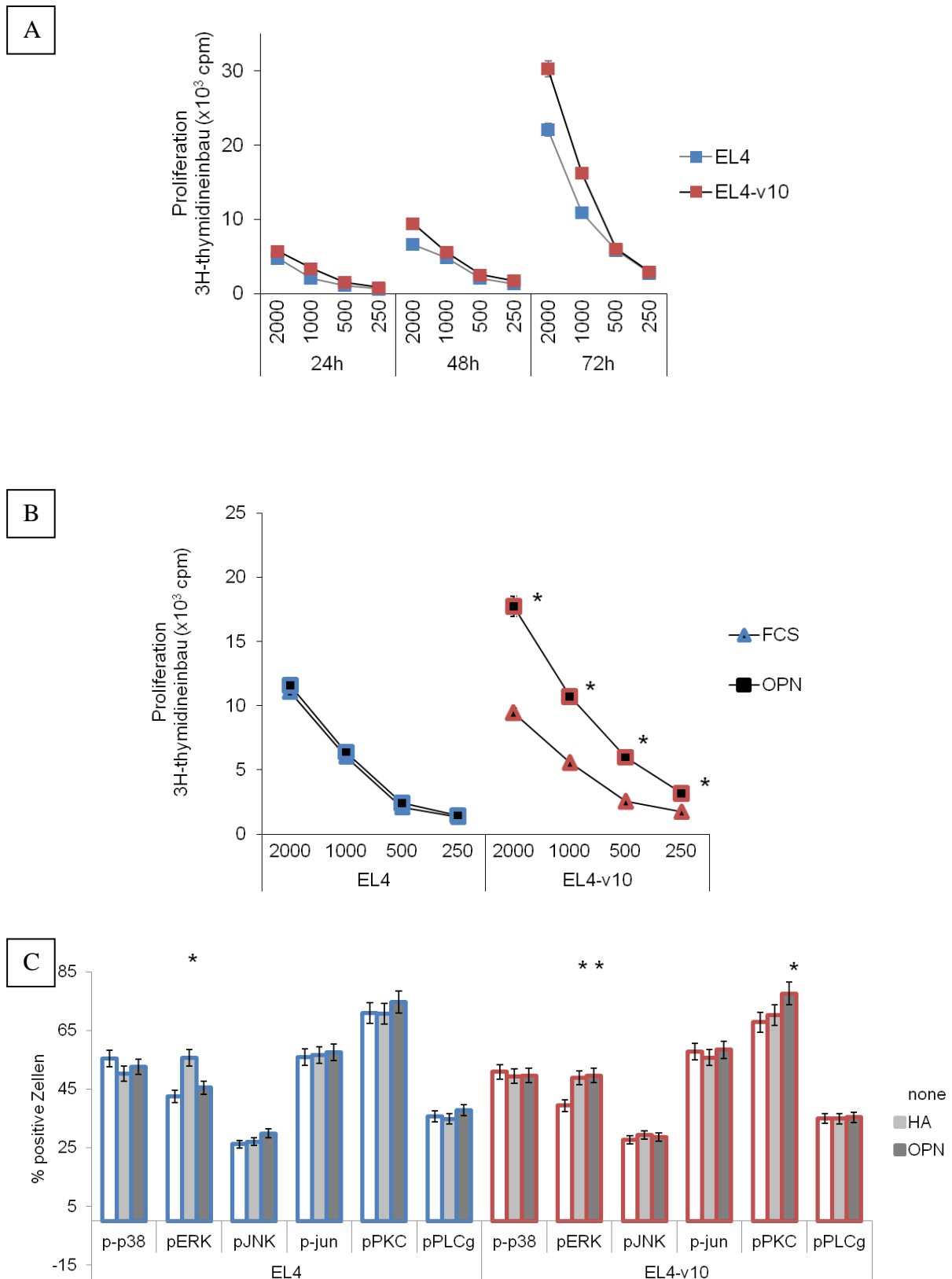
Die Expression der CD44v10-Isoform bewirkte sowohl eine verstärkte Adhäsion als auch Migration zu OPN, verstärkte die Adhäsion an FN, beeinflusste aber weder die Adhäsion noch die Migration in Richtung HA.

### 3.1.4 Einfluss von CD44v10 auf Proliferation und Apoptoseresistenz

Da die Aktivierung von CD44 zu gesteigerter Proliferation und Apoptoseresistenz in Lymphozyten und Tumorzellen führen kann, sollte geklärt werden, ob dies auch für die Stimulation der CD44v10-Isoform gilt.

Ohne Stimulation konnte kein Proliferationsvorteil zwischen EL4 und EL4-v10 beobachtet werden, aber nach OPN-Stimulation proliferierten EL4-v10-Zellen deutlich stärker als die parentale Zelllinie. Dies ging mit signifikant erhöhter ERK1/2- und PKC- Phosphorylierung einher (Abbildung 18).



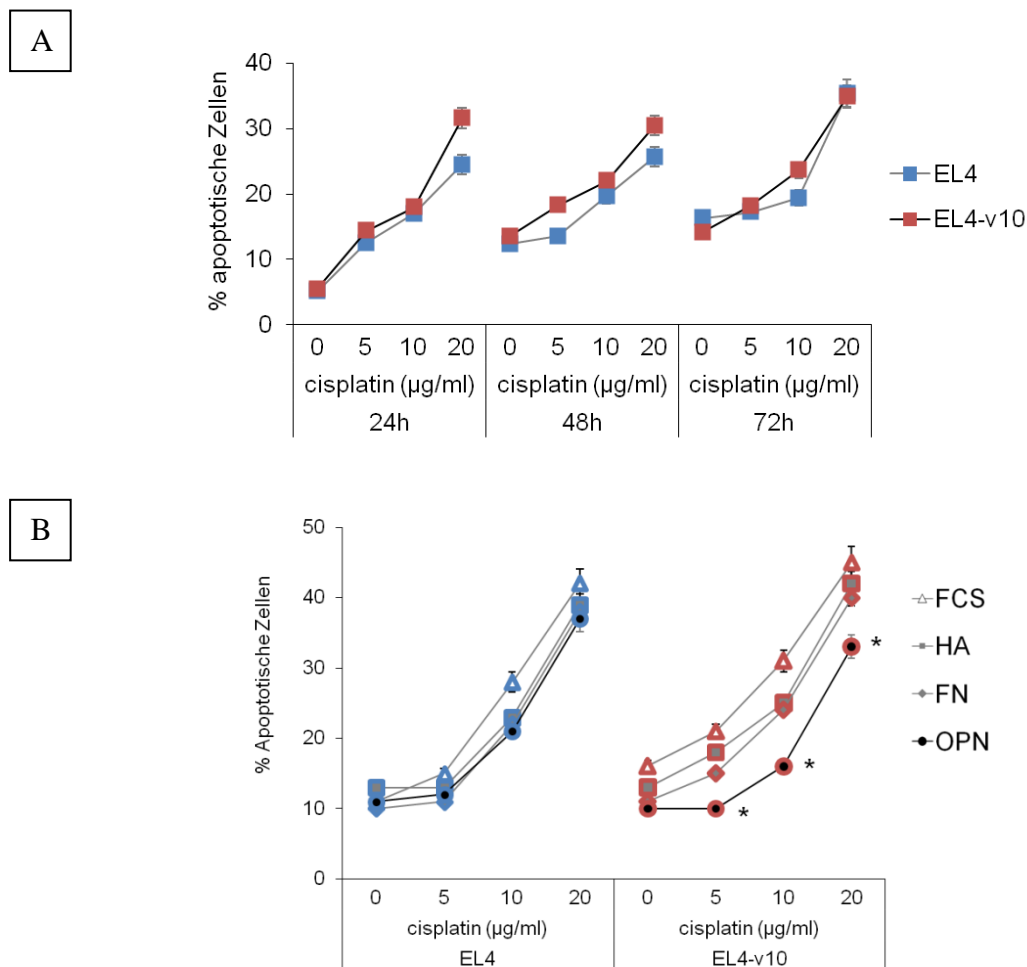


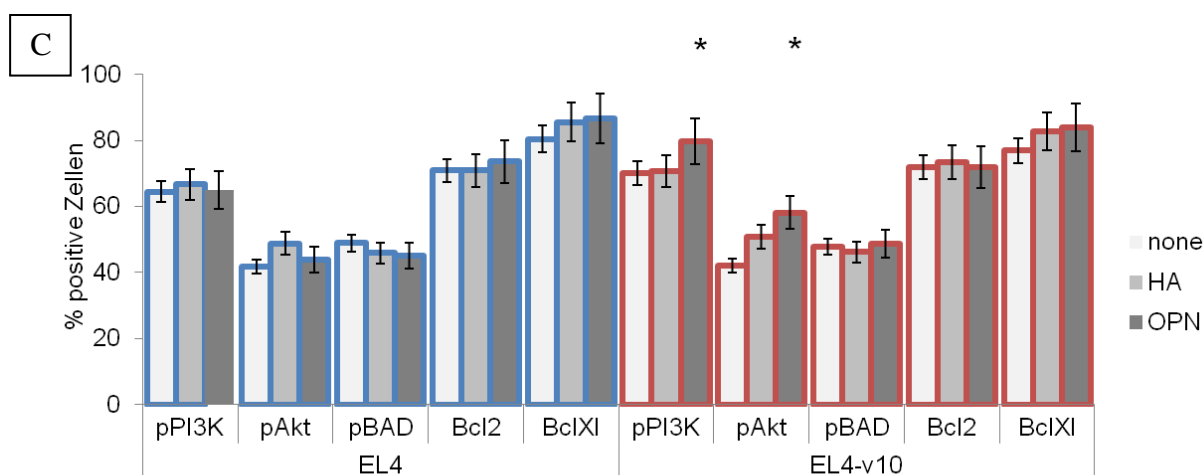
**Abbildung 18: Proliferation von EL4- und EL4-v10-Zellen**

Die Zellen wurden (A) ohne Stimulation oder (B, C) in zuvor mit BSA, HA bzw. OPN beschichtete 96-well-Platten ausgesät. (A,B) Die Zellen wurden 48h bei 37°C inkubiert und <sup>3</sup>H-Thymidin (1μCi) 16h vor Ablauf der Inkubationszeit zugesetzt. Die Proliferation wurde durch Bestimmung der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation gemessen. (C) Die Zellen wurden 48h bei 37°C inkubiert, anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen die

angegebenen Proteine und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt. Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver EL4- und EL4-v10 Zellen. (A,B,C) Signifikante Unterschiede zu unbehandelten Zellen sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Ohne Stimulation zeigten EL4- und EL4-v10-Zellen keine unterschiedliche Apoptoseresistenz nach Cisplatinbehandlung, aber nach OPN-Stimulation waren EL4-v10-Zellen weniger Apoptose anfällig als EL4-Zellen. Eine Stimulation mit HA oder FN beeinflusste die Apoptoserate beider Zelllinien nicht. Nach OPN-Stimulation war eine erhöhte PI3K- und Akt-Phosphorylierung in EL4-v10-Zellen feststellbar. Die Expression und Aktivierung antiapoptotischer Moleküle blieb unverändert (Abbildung 19).





### Abbildung 19: Apoptoseresistenz von EL4- und EL4-v10-Zellen

Die Zellen wurden (A) ohne Stimulation oder (B, C) in zuvor mit BSA, HA, FN bzw. OPN beschichtete 96-well-Platten ausgesät. (A) Die Zellen wurden mit titrierten Mengen an Cis-Platin für 24h, 48h und 72h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid und AnnexinV angefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Die Zellen wurden mit titrierten Mengen an Cis-Platin für 48h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid und AnnexinV angefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (C) Die Zellen wurden 48h bei 37°C inkubiert, anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen die angegebenen Proteine und Fluoreszenz-markierten Sekundäranantikörper angefärbt. Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver EL4- und EL4-v10 Zellen. (A,B,C) Signifikante Unterschiede zu unbehandelten Zellen sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Die Expression von CD44v10 in EL4-v10 steigerte die Adhäsion und Migration an OPN *in vitro* signifikant und das *Homing* in die Haut und die dränierenden Lymphknoten besonders unter inflammatorischen Bedingungen *in vivo*. Die Ergebnisse sind mit der CD44v10-abhängigen Extravasation von Lymphozyten in die Haut in Autoimmunerkrankungen vergleichbar (Freyschmidt-Paul et al. 2000). Die CD44v10-Expression erhöhte außerdem die Proliferation und Apoptoseresistenz nach OPN-Stimulation.

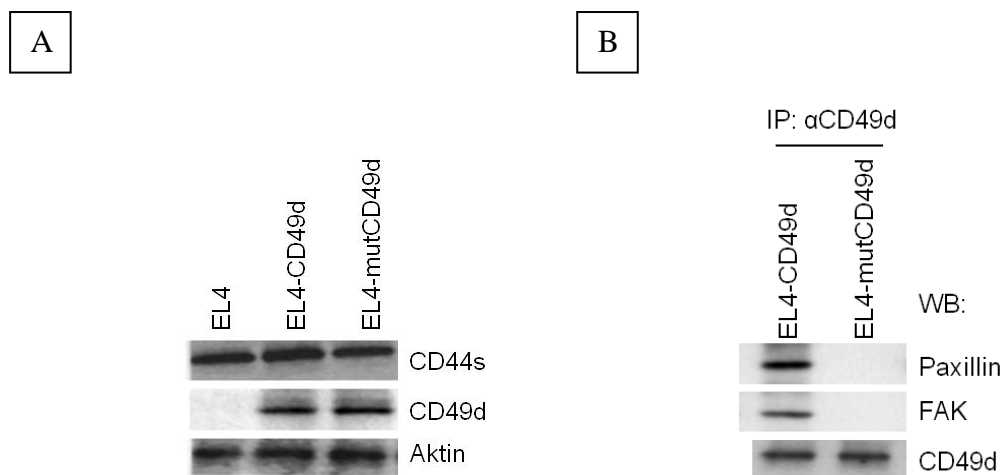
## 3.2 CD44-CD49d-Assoziation fördert Adhäsion und Migration von Lymphozyten durch Adaptermolekül-Komplexbildung in GEM

In Lymphozyten von AA betroffenen C3H/HeJ-Mäusen konnte eine erhöhte T-Zell-Aktivierung, Migrationsaktivität, Proliferation und Apoptoseresistenz im Vergleich zu naiven Mäusen festgestellt werden. Diese Hyperaktivität konnte auf die verstärkte Kooperation zwischen CD44 und CD49d in diesen Zellen zurückgeführt werden (Marhaba et al. 2006). Um die gezeigte erhöhte Kooperation zwischen beiden Molekülen näher zu untersuchen, wurden

CD49d<sup>-</sup> EL4-Zellen mit Wildtyp CD49d-cDNA (EL4-CD49d) oder mit mutierter CD49d-cDNA (EL4-mutCD49d) transfiziert (Singh 2011). Die Punktmutation in der Paxillin-Bindungsstelle von CD49d führt zum Austausch von Serin gegen Alanin in Position 988, so dass Paxillin nicht mehr gebunden werden kann und keine Signaltransduktion erfolgt.

### 3.2.1 Expression und Assoziation von CD44 und CD49d in EL4-Zellen

Dr. V. Singh konnte zeigen, dass nach der Transfektion der EL4-Zellen mit entweder CD49d-cDNA oder mutCD49d-cDNA, diese CD49d bzw. mutCD49d vergleichbar stark exprimierten. Die Expression anderer T-Zell-Aktivierungsmarker oder Adhäsionsmoleküle änderten sich durch die Transfektion nicht. Nur in EL4-CD49d-Zellen assoziierte CD49d mit FAK und Paxillin. Änderungen im Adhäsions-Migrations- und Proliferationsverhalten sowie in der Apoptoseresistenz konnten daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Expression von CD49d zurückgeführt werden (Abbildung 20; entnommen aus Singh 2011).



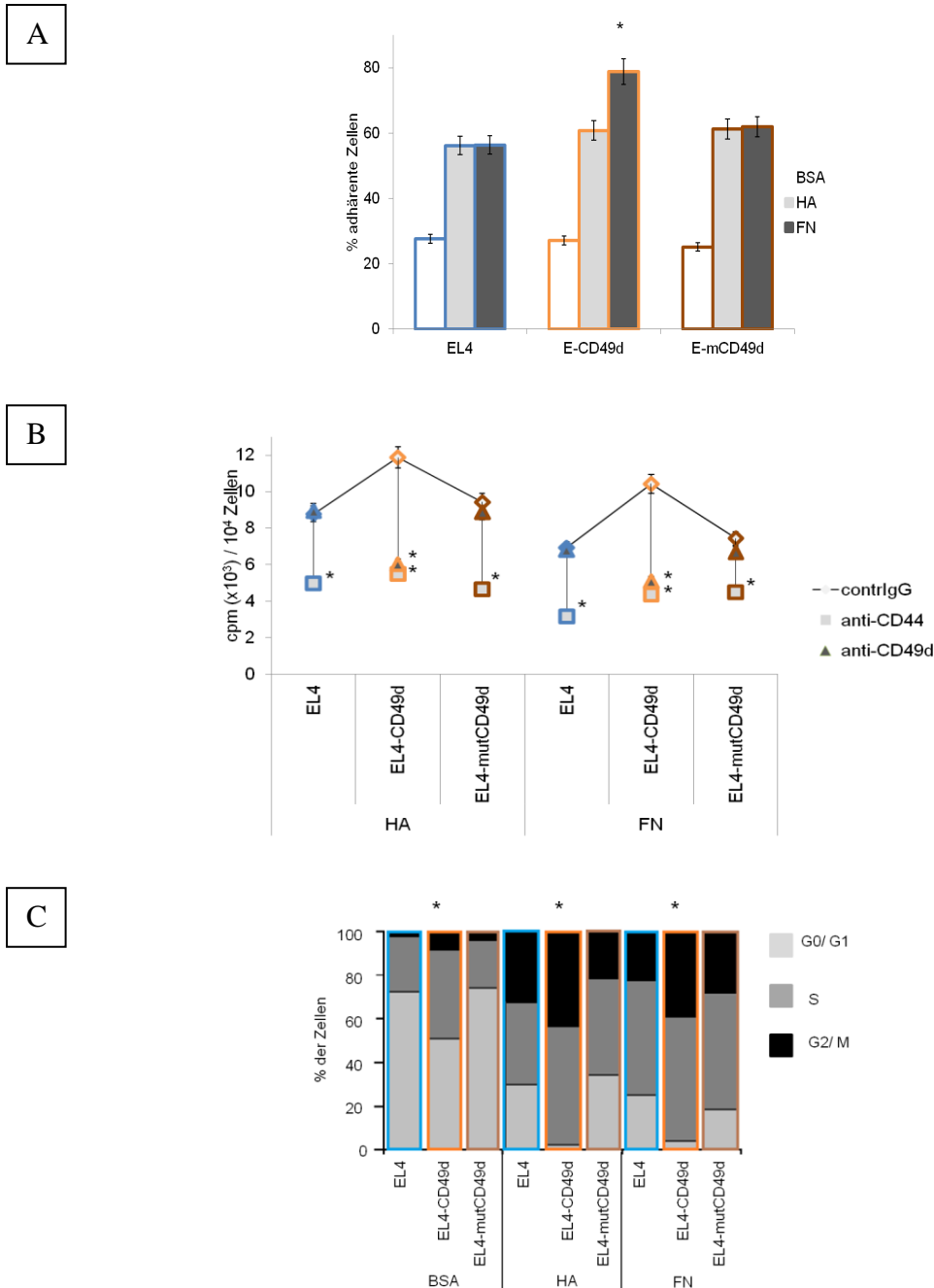
**Abbildung 20: Expression von CD44 und CD49d und Assoziation von CD49d mit Paxillin sowie FAK in EL4-, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen**

(A) EL4-, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen wurden in 1% Triton-X-100 lysiert und in einem 10%igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen CD44 und CD49d, sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert. Als Kontrolle diente Aktin. (B) EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen wurden in Lysispuffer mit 1 % Lubrol lysiert um Immunkomplexe mit anti-CD49d zu präzipitieren. Die Immunkomplexe wurden in einem 10%igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen Paxillin, FAK sowie CD49d und HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert. (entnommen aus Singh 2011)

### 3.2.2 CD44-CD49d-Interaktion fördert Proliferation und Apoptoseresistenz

Aktivierte Lymphozyten von AA betroffenen Tiere weisen durch die Kooperation von CD44 mit CD49d eine erhöhte Proliferation und Apoptoseresistenz gegenüber naiven Lymphozyten auf (Marhaba et al. 2006), daher wurden EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d auf ihr Proli-

ferationsverhalten und ihre Apoptiseresistenz untersucht. Ohne Stimulation proliferierten die drei Zelllinien gleichstark, aber nach Stimulation mit HA bzw. FN proliferierten EL4-CD49d-Zellen deutlich stärker als EL4- oder EL4-mutCD49d-Zellen. Die Proliferation nach HA- oder FN-Stimulation konnte in allen drei Zelllinien durch anti-panCD44 um circa 35% inhibiert werden. Die Proliferation der EL4-CD49d-Zellen wurde ebenfalls mit anti-CD49d um 30% inhibiert. Nach HA- und FN-Stimulation wurde in EL4-CD49d-Zellen zudem ein höherer Anteil an Zellen ermittelt, die sich in der S- und G2-M-Phase befanden (Abbildung 21).

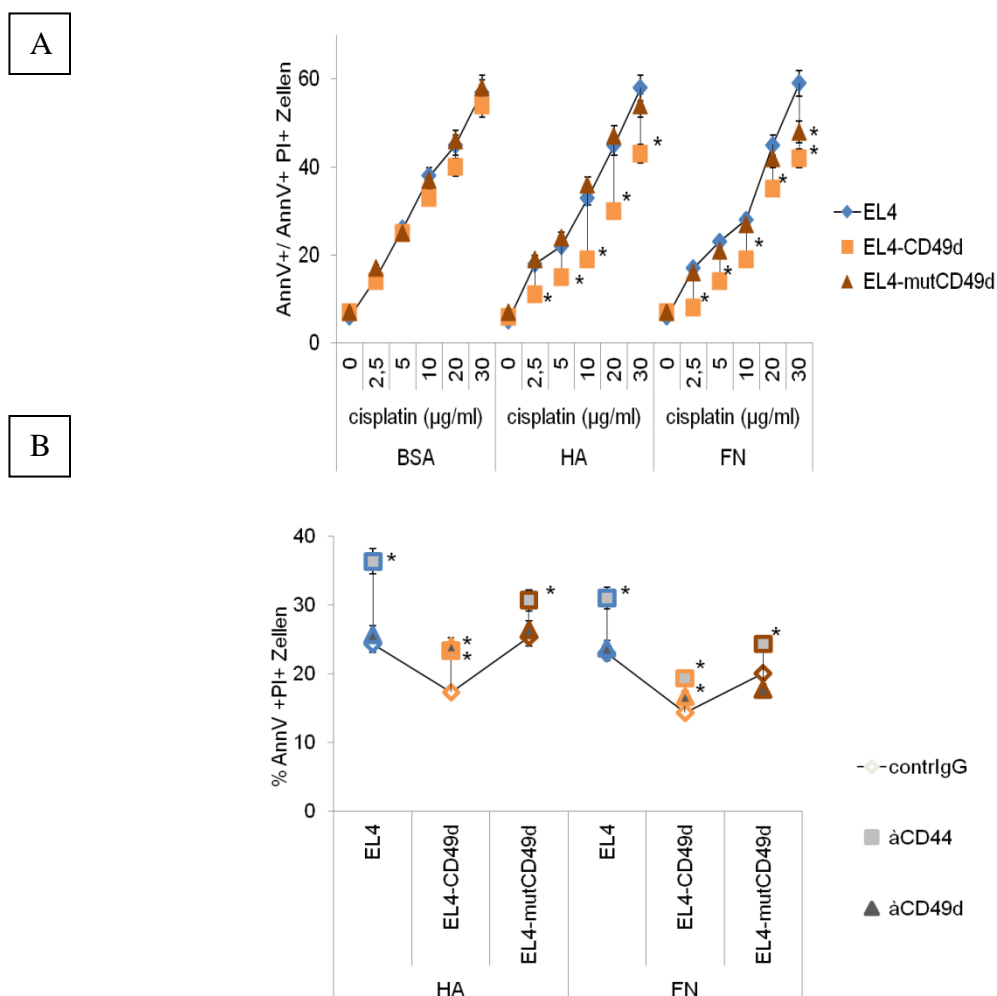


**Abbildung 21: Proliferation von EL4-, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen**

Die Zellen wurden (A) ohne Stimulation oder (B, C) in zuvor mit HA bzw. FN beschichtete in 96-well-Platten ausgesät. (A,B) Die Zellen wurden 48h bei 37°C

inkubiert und  $^3\text{H}$ -Thymidin ( $1\mu\text{Ci}$ ) 16h vor Ablauf der Inkubationszeit zugesetzt. Die Proliferation wurde durch Bestimmung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation gemessen. (C) Die Zellen wurden 48h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend fixiert und die DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Der DNA-Gehalt wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Signifikante Unterschiede zu EL4 sind durch \* gekennzeichnet. (B) Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle (ContrIgG) und Antikörperbehandlung sind durch \* gekennzeichnet. (C) Signifikante Unterschiede zu EL4 sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Die drei Zelllinien unterschieden sich nicht in ihrer Apoptoseresistenz gegenüber Cisplatin, wenn keine Stimulation vorlag. Die Apoptoseresistenz der EL4-CD49d-Zellen war jedoch nach HA- bzw. FN-Stimulation höher als die der EL4- oder EL4-mutCD49d-Zellen. Weiterhin inhibierte anti-panCD44 in allen Zelllinien die Apoptoseresistenz, während anti-CD49d die Apoptoseresistenz in EL4-CD49d-Zellen negativ beeinflusste (Abbildung 22).



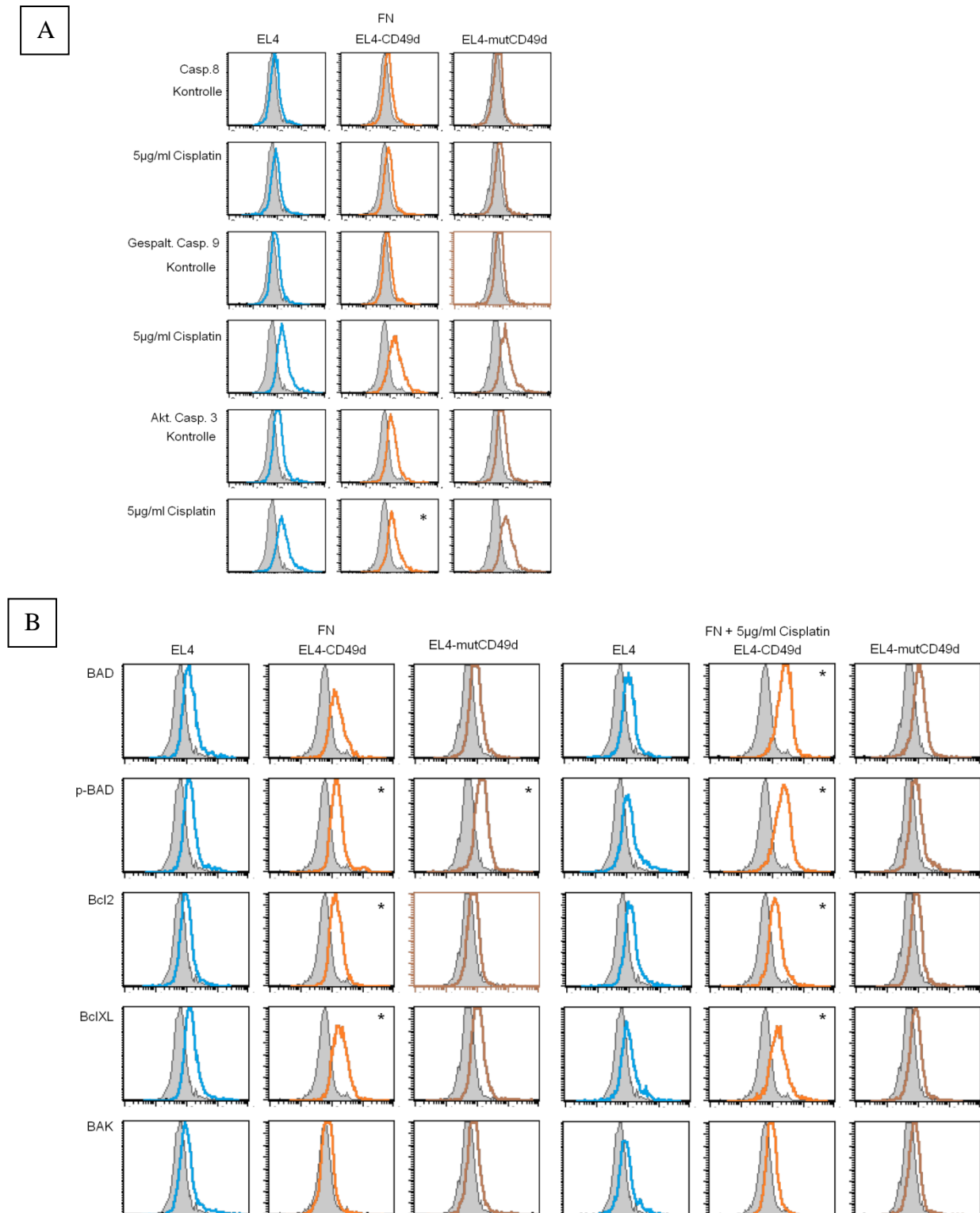
**Abbildung 22: Apoptoseresistenz von EL4-, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen**

Die Zellen wurden in 96-well-Platten, die zuvor mit BSA, HA bzw. FN beschichtet wurden, ausgesät. (A) Die Zellen wurden mit titrierten Mengen an Cis-Platin für 48h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid und AnnexinV angefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Die Zellen wurden mit je  $10\mu\text{g/ml}$  anti-CD44 (IM7) oder anti-CD49d (PS2) sowie mit  $5\mu\text{g/ml}$  Cis-Platin für 48h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden

---

die Zellen mit Propidiumiodid und AnnexinV angefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Signifikante Unterschiede zu EL4 sind durch \* gekennzeichnet. (B) Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle (ContrIgG) und Antikörperbehandlung sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

EL4-CD49d-Zellen zeigten nach FN-Stimulation und Cisplatin-Behandlung geringere Caspase3-Aktivität und Caspase9-Spaltprodukte als EL4 oder EL4-mutCD49d, während die Expression von Caspase8 in allen drei Zelllinien gleich hoch war. Die Expression der antiapoptotischen Moleküle Bcl2 sowie BclXl und die Phosphorylierung von BAD war in EL4-CD49d-Zellen signifikant erhöht. Das Expressionsniveau des proapoptotischen Moleküls BAK war nach FN-Stimulation und Cisplatin-Behandlung in EL4-, EL4-CD49d- und EL4-mutCD49d-Zellen unverändert (Abbildung 23).



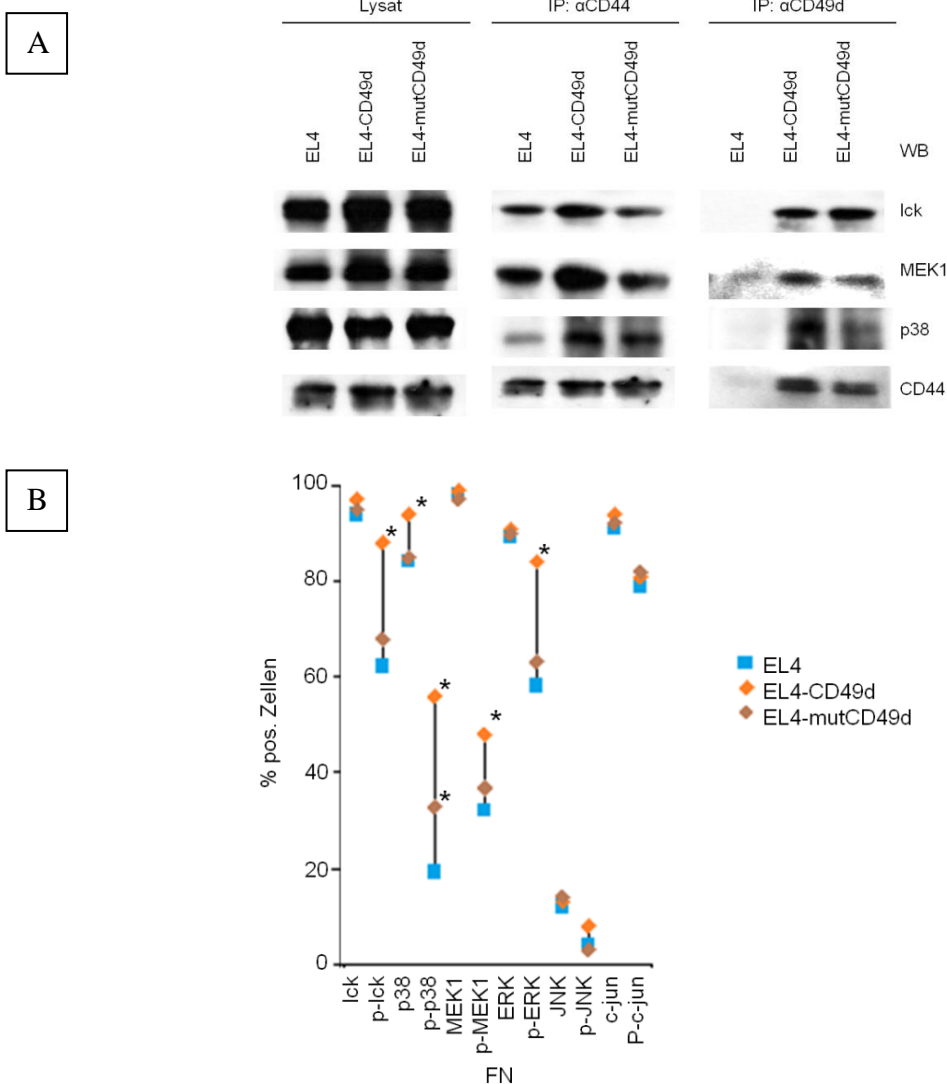
**Abbildung 23: Expression von Caspasen sowie anti- und proapoptischen Molekülen nach Cisplatin-Behandlung**

Die Zellen wurden in 96-well-Platten, die zuvor mit FN beschichtet wurden, ausgesät und mit 5µg/ml Cisplatin für 48h bei 37°C inkubiert, anschließend mit Antikörpern gegen (A) Caspasen und (B) gegen anti- sowie proapoptische Moleküle und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt. Dargestellt ist die Überlagerung der Negativkontrolle (graue Fläche) und der spezifischen Antikörperfärbung (schwarze Linie). Signifikante Unterschiede zu EL4-Zellen sind durch \* gekennzeichnet. Ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt.



### 3.2.3 CD44-CD49d-Interaktion fördert die Lymphozyten-Aktivierung

Die FN-Stimulation verstärkte die Komplexbildung zwischen lck, p38 und MEK1 mit CD44 und CD49d in EL4-CD49d-Zellen und deren Phosphorylierung. In EL4-CD49d-Zellen wurde Erk nach der Stimulation mit FN aktiviert (Abbildung 24).

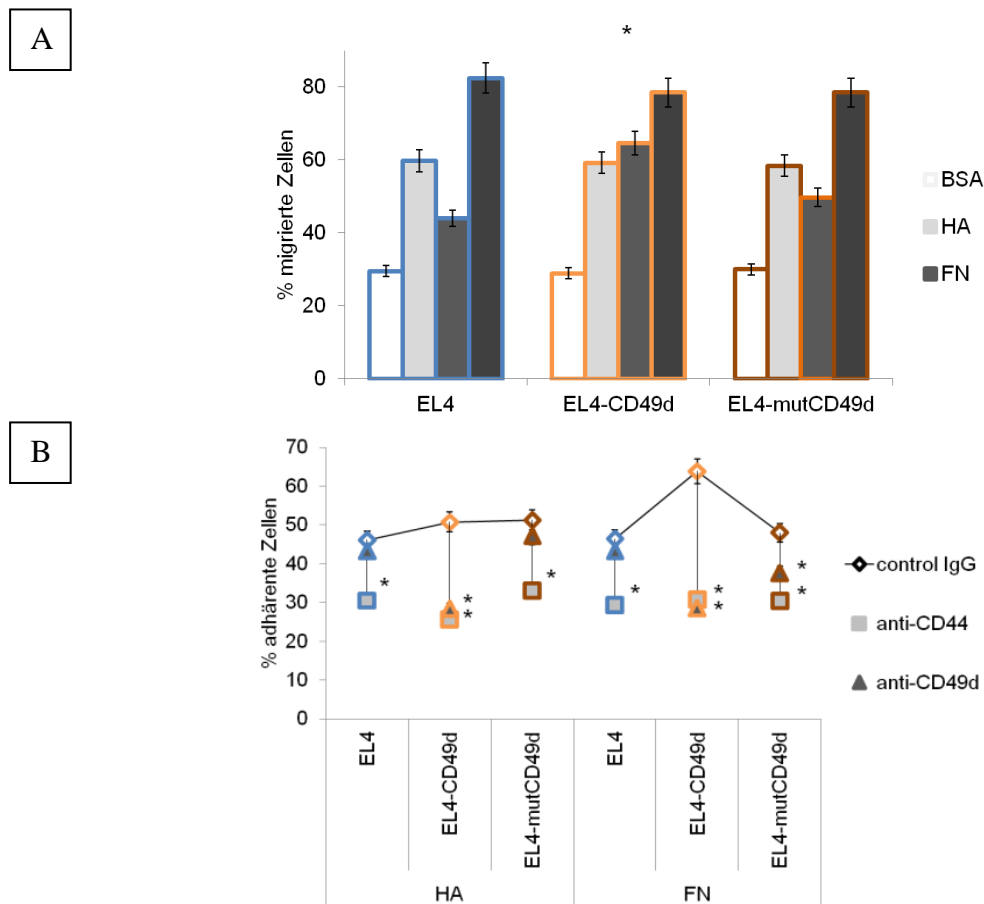


**Abbildung 24: Aktivierungszustand von EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d nach FN-Stimulation**

(A) EL4-, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen wurden entweder in 1% Triton-X-100 (Lysat) oder mit 1% Lubrol (IP) lysiert und in einem 10%igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet und mit den Antikörpern gegen CD44, lck, MEK1 und p38 sowie einem HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert. (B) EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen wurden FN stimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen lck, phospho-lck, MEK1, phospho-MEK1, ERK und phospho-ERK und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern durchflusszytometrisch detektiert. Signifikante Unterschiede zu EL4 sind durch \* gekennzeichnet.

### 3.2.4 CD44-CD49d-Interaktion fördert Adhäsion und Migration

EL4-, EL4-CD49d- und EL4-mutCD49d-Zellen adhärten mit etwa 50% der Gesamtzellzahl gleichstark an HA. An FN adhärte EL4-CD49d mit circa 10% mehr Zellen als EL4 bzw. EL4-mutCD49d. Die Adhäsion an HA und FN wurde durch anti-panCD44 in EL4 und EL4-mutCD49d um circa 30% inhibiert und in EL4-CD49d sogar um 40%. Anti-CD49d verringerte die Adhäsion an HA in EL4-CD49d-Zellen gleichstark wie anti-panCD44. Die Blockade von CD49d mittels anti-CD49d verringerte die Adhäsion an FN von EL4-CD49d-Zellen um 40% und EL4-mutCD49d um 15% (Abbildung 25).

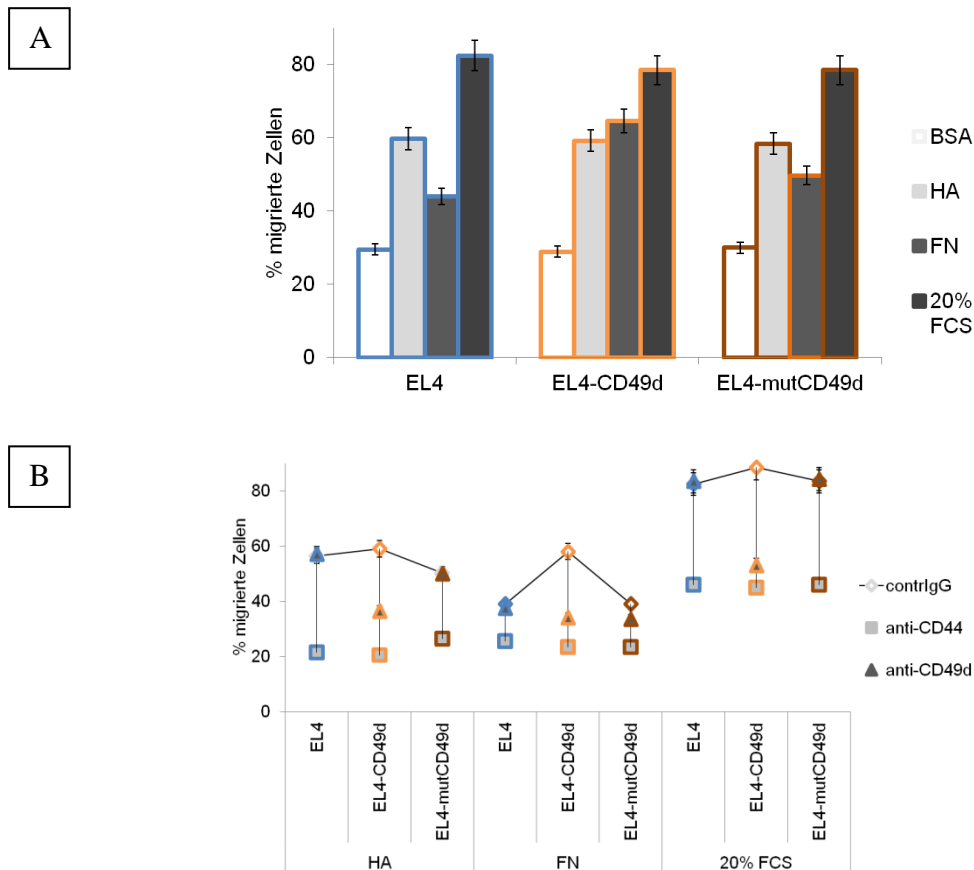


**Abbildung 25: Adhäsion von EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d *in vitro***

Die Zellen wurden in 96-well-Platten, die zuvor mit BSA, HA bzw. FN beschichtet wurden, (A) ohne und (B) mit je 10 µg/ml anti-CD44 (IM7) oder anti-CD49d (PS2) ausgesät. Nach 6h bei 37°C wurden die Platten gewaschen und die adhärenzten Zellen mit Kristallviolett angefärbt, mit Essigsäure lysiert und bei OD<sub>595</sub> gemessen. (A) Signifikante Unterschiede zwischen EL4 und EL4-CD49d bzw. EL4-mutCD49d sind durch \* gekennzeichnet. (B) Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle (ContrIgG) und Antikörperbehandlung sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Entsprechende Ergebnisse wurden für die Transwell-Migration beobachtet. Von den drei Zelllinien migrierten jeweils etwa 60% der Zellen in Richtung HA, während circa 15% mehr EL4-

CD49d-Zellen in Richtung FN migrierten als EL4- oder EL4-mutCD49d-Zellen, bei denen nur etwa 45% der Zellen in Richtung FN migrierten. Anti-panCD44 inhibiert sowohl die gerichtete Migration nach HA drastisch um 60% als auch nach FN um circa 30%, während anti-CD49d nur die HA- sowie die FN-Migration in EL4-CD49d-Zellen um jeweils 30% inhibierte (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Transwell-Migration von EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d *in vitro***

Die Zellen wurden in der oberen Teil einer Boyden-Kammer (A) ohne und (B) mit je 10 µg/ml anti-CD44 (IM7) oder anti-CD49d (PS2) ausgesät. Im unteren Teil befand sich Medium/1% BSA, HA bzw. FN. Nach 6h bei 37°C wurden die Zellen in der unteren Kammer gezählt. (A) Signifikante Unterschiede zu EL4 sind durch \* gekennzeichnet. (B) Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle (ContrIgG) und Antikörperbehandlung sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

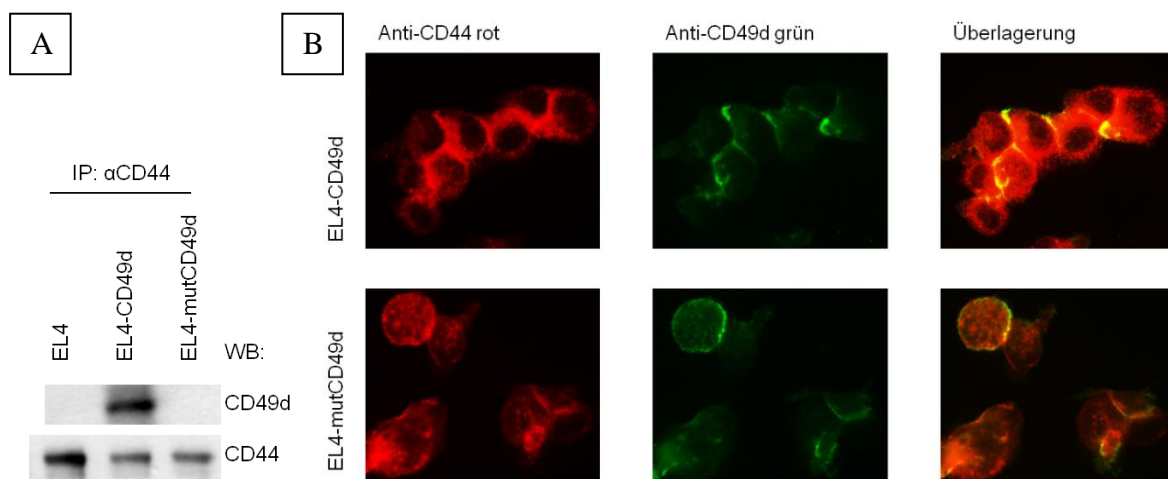
Obwohl die Expression von Wildtyp CD49d nicht zu einer erhöhten Adhäsion oder Migration an HA führte, wurden beide mittels anti-CD49d in EL4-CD49d-Zellen inhibiert. Dies deutet auf eine Kooperation von CD44 und CD49d in EL4-CD49d-Zellen hin und entspricht dem gezeigten erhöhten Aktivierungszustand in AA-Effektorzellen (Marhaba et al. 2006). Die Adhäsion und Migration an FN wurde in EL4-Zellen durch CD44 und CD49d vermittelt und wurde sowohl durch anti-panCD44 als auch durch anti-CD49d inhibiert. Für die CD49d-

vermittelte Adhäsion und Migration ist eine intakte Paxillin-Bindungsstelle nötig, da in EL4-mutCD49d-Zellen keine stärkere Adhäsion bzw. Migration als in den parentalen EL4-Zellen nachzuweisen war.

### 3.2.5 Assoziationen des Zytoskelett mit CD44 und CD49d

Die kooperativen Effekte bei Adhäsion und Migration zwischen CD44 und CD49d weisen auf die gemeinsame Nutzung der Adaptermoleküle hin. Entsprechende Publikationen unterstützen diese Annahme (Marhaba et al. 2006; Nandi et al. 2004). Daher wurden die Assoziationen mit dem Zytoskelett analysiert.

Auf HA-beschichteten Platten, kolokalisierten CD44 und CD49d in EL4-CD49d-Zellen an Zell-Zellkontaktstellen, während die beiden Moleküle in EL4-mutCD49d kaum kolokalisierten. Ebenso wurde CD49d nur in EL4-CD49d-Zelllysats mit CD44 ko-immunpräzipitiert, nicht jedoch in EL4-mutCD49d (Abbildung 27).

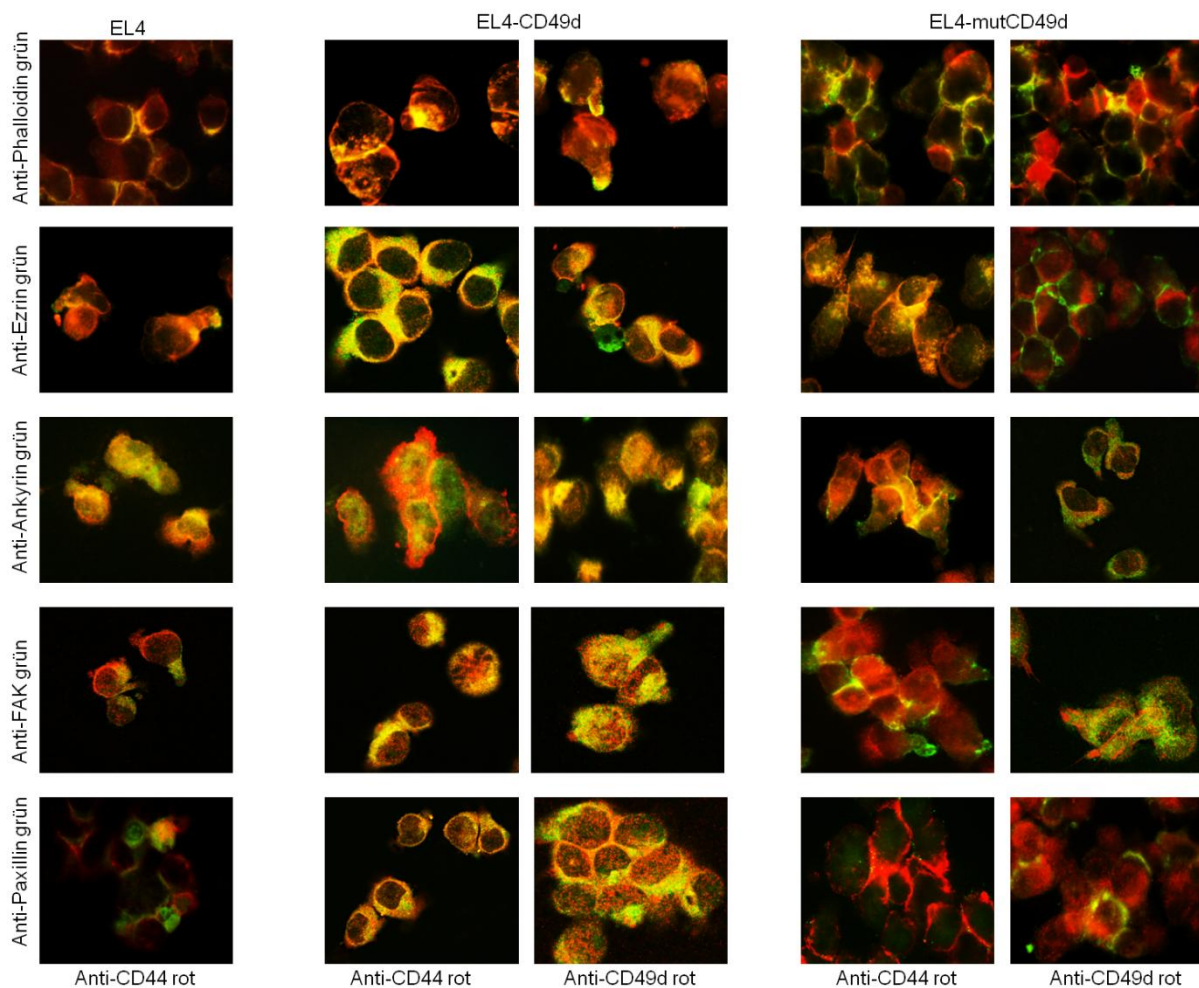


**Abbildung 27: Assoziation von CD49d mit CD44 in EL4-CD49d und EL4-mutCD49d nach HA-Stimulation**

(A) EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen wurden mit HA stimuliert und anschließend in Lysispuffer mit 1 % Lubrol lysiert um Immunkomplexe mit anti-CD44 zu präzipitieren. Die Immunkomplexe wurden in einem 10 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit einem Antikörper gegen CD49d und HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert. (B) Die Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-Well-Platten, die zuvor mit HA beschichtet wurden, ausgesät. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit anti-CD44 und anti-CD49d und Cy2- oder Cy3-markierten Sekundärantikörpern gefärbt und am Konfokalmikroskop ausgewertet. Die Überlagerung der Einzelfärbungen ist dargestellt. Eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung bei Überlagerung der beiden Einzelfärbungen angezeigt.

CD44 kolokalisierte mit Ezrin und Ankyrin auf HA-beschichteten Platten. In EL4-CD49d-Zellen, nicht aber in EL4-mutCD49d-Zellen, kolokalisierte CD49d mit FAK und Paxillin. Nur in EL4-CD49d wurde die Kolokalisation zwischen CD44 und den Assoziationspartnern von

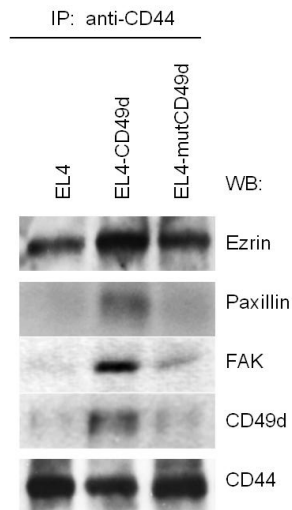
CD49d FAK und Paxillin stärker und ebenso die Kolokalisation von CD49d mit Ezrin, Ankyrin und F-Actin (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Kolokalisation von CD44 bzw. CD49d mit Phalloidin, Ezrin, Ankyrin und Paxillin in EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d nach HA-Stimulation**

Die Zellen wurden auf Glasplättchen, die zuvor mit HA beschichtet wurden, in 24-well-Platten ausgesät. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit anti-CD44 oder anti-CD49d und Cy3-Sekundärantikörper sowie mit Phalloidin-Cy2, anti-Ezrin, anti-FAK oder anti-Paxillin und Cy2-Sekundärantikörper gefärbt und am Konfokalmikroskop ausgewertet. Die Überlagerung der Einzelfärbungen ist dargestellt. Eine Kolokalisation wird durch eine Gelbfärbung bei Überlagerung der beiden Einzelfärbungen angezeigt.

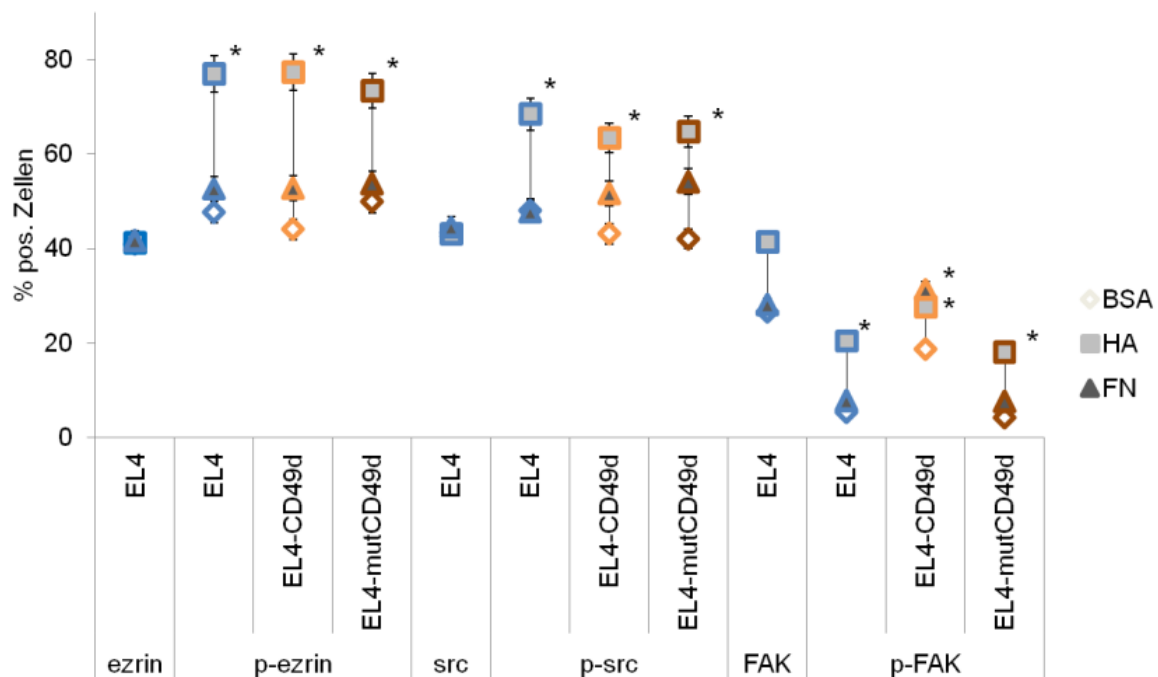
Nach FN-Stimulation wurde CD44 mit FAK und Paxillin in EL4-CD49d-Zelllysate immunpräzipitiert. In EL4-mutCD49d-Zelllysate assoziierte FAK deutlich schwächer mit CD44 und eine Paxillinassoziation konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Koimmunopräzipitation von CD44 mit Ezrin, Paxillin, FAK und CD49d nach FN-Stimulation**

EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen wurden mit FN stimuliert und anschließend in Lysispuffer mit 1 % Lubrol lysiert um Immunkomplexe mit anti-CD44 zu präzipitieren. Die Immunkomplexe wurden in einem 12 %igen Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen Ezrin, Paxillin, FAK und CD49d und HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert.

Durchflusszytometrisch wurde nachgewiesen, dass durch die HA-Stimulation in allen drei Zelllinien Ezrin, Src und FAK phosphoryliert wurde, während durch FN-Stimulation Src in allen drei, FAK aber nur in EL4-CD49d phosphoryliert wurde (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Aktivierung von Signalkaskaden nach HA- und FN-Stimulation**

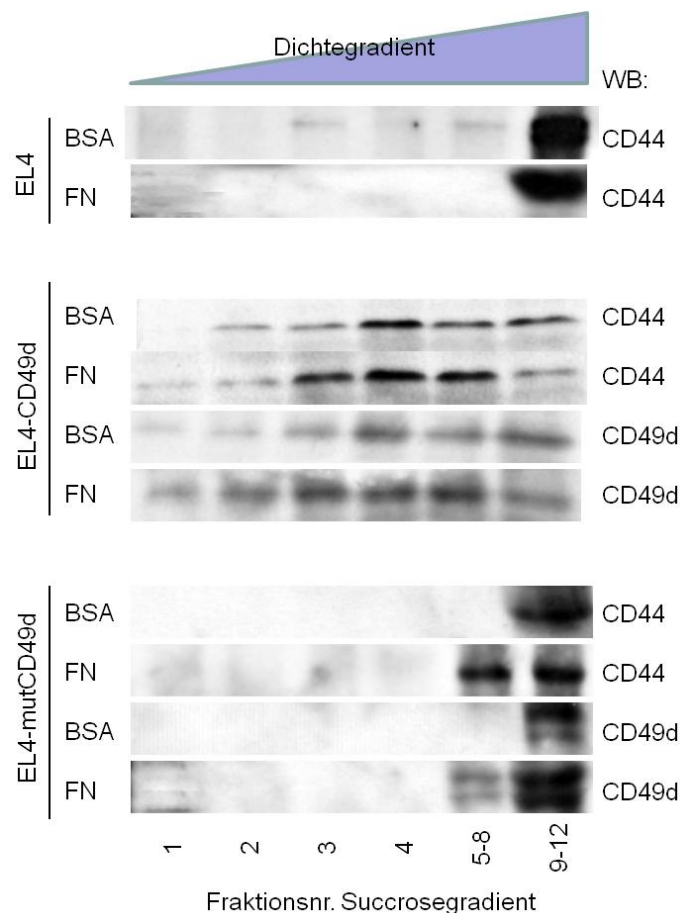
EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen wurden mit BSA (Negativkontrolle), HA bzw. FN stimuliert und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen Ezrin,



phospho-Ezrin, Src, phospho-Src, FAK und phospho-FAK und Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern durchflusszytometrisch detektiert. Signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle sind durch \* gekennzeichnet.

### 3.2.6 Lokalisation des CD44-CD49d-Komplexes in glykolipidreichen Mikrodomänen

Nur die Transfektion mit Wildtyp CD49d-cDNA in EL4-Zellen führte unabhängig von einer Stimulation zur Rekrutierung von CD44 und CD49d in die leichten Succrosegradient-Fractionen (1-4), die den glykolipidreichen Mikrodomänen (*Glycolipid enriched Mikrodomain*, GEM) der Zellmembran entspricht. Die FN-Stimulation verstärkte die Rekrutierung in die leichten Fractionen. In unstimulierten EL4-mutCD49d-Zellen war CD44 und CD49d ausschließlich in den schweren Fractionen (9-12) und nach der FN-Stimulation noch in den Fractionen 5-8 nachweisbar (Abbildung 31).



#### Abbildung 31: Verteilung von CD44 und CD49d in der Zellmembran nach FN-Stimulation

EL4, EL4-CD49d und EL4-mutCD49d-Zellen wurden mit FN stimuliert und anschließend in Lysispuffer mit 1 % Lubrol lysiert. Das Lysat wurde durch eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation (40%, 30%, 5% Succrose) aufgeteilt (15h, 100.000g). Anschließend wurden zwölf Fractionen gesammelt, von denen die schweren Fractionen 9-12 und die mittelschweren Fractionen 5-11 vereinigt wurden. Die Fractionen wurden in einem 12 %igen Gel aufgetrennt, auf eine

---

Nitrozellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen CD44 und CD49d und HRP-markiertem Sekundärantikörper detektiert.

Durch die Transfektion mit Wildtyp CD49d-cDNA in EL4-Zellen wurde Proliferation, Apoptoseresistenz und Aktivierungszustand der Zellen nach Stimulation mit FN signifikant erhöht. Die Adhäsion und Migration an FN wurde ebenfalls gesteigert. EL4-CD49d-Zellen profitierten von der Komplexbildung von CD44 mit CD49d und über die Rekrutierung in die GEM von der Assoziation mit den jeweiligen Adaptermolekülen. In den AA-Effektorzellen wurde die verstärkte Assoziation ebenfalls gezeigt (Marhaba et al. 2006).

### **3.3 Die Keratine K31 und K71 sind Autoantigene der Alopecia Areata**

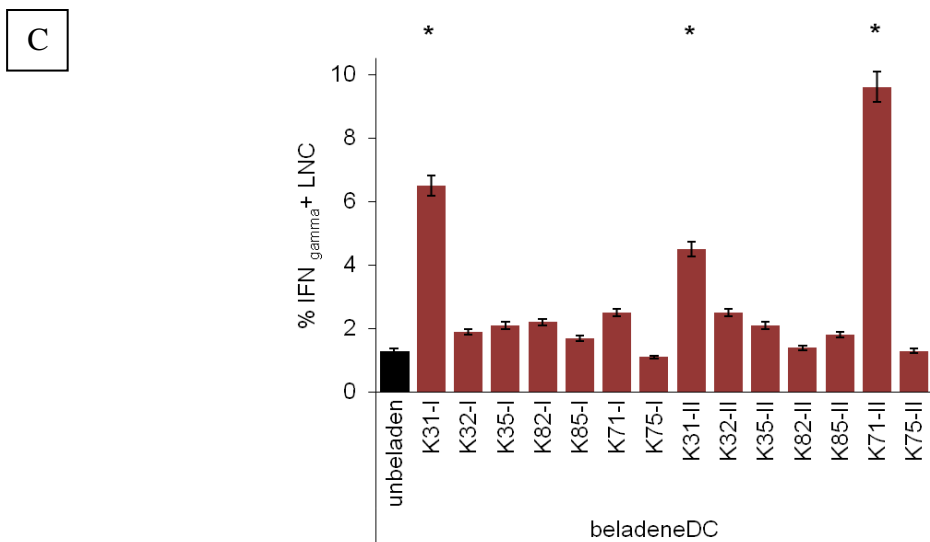
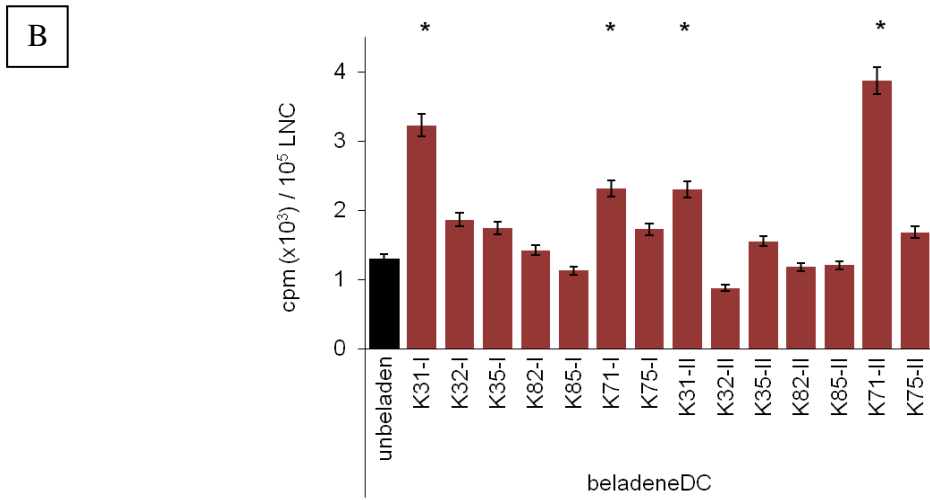
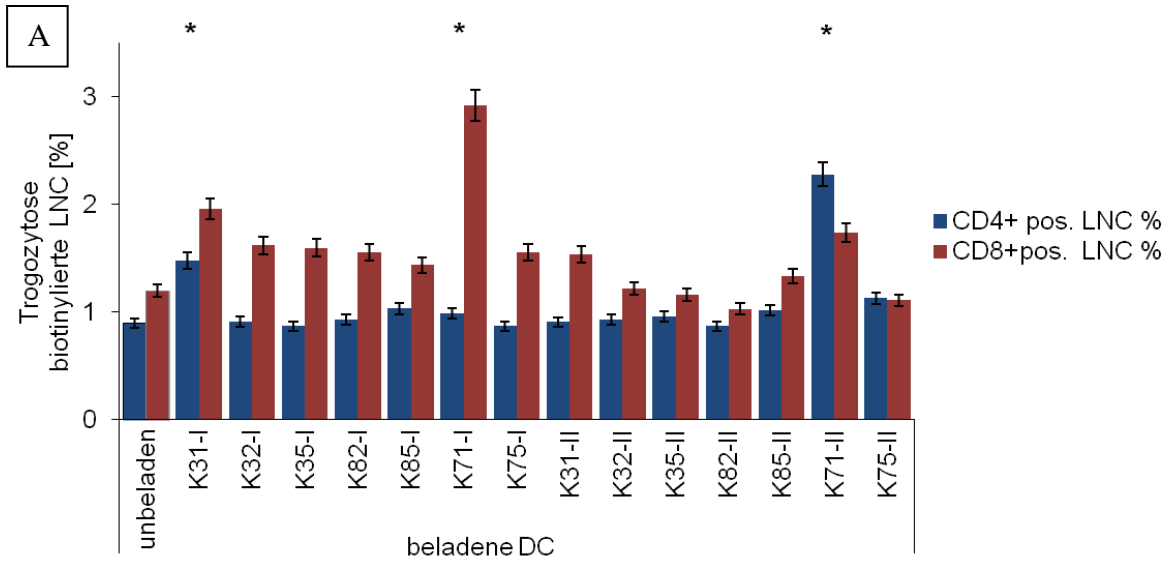
#### **3.3.1 Keratine als Autoantigene der AA**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten initiiierende Autoantigene im C3H/HeJ-Mausmodell identifiziert werden um die Möglichkeit einer therapeutischen Toleranzinduktion zu überprüfen. Als potentielle Autoantigene wurden Mauskeratine K31, K32, K35, K82, K85, K71 und K75 ausgewählt, die spezifisch im Haarfollikel während der Anagenphase exprimiert werden. Das Vorhersage-Programms „SYFPEITHI“ berechnet Peptide aus der Aminosäuresequenz der Proteine unter Berücksichtigung möglicher Proteinfragmentierung und der Bindungsaffinität an entweder Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC I; Kx-I) oder an MHC II (Kx-II). Je Keratin und MHC-Klasse wurde vier Peptide ausgewählt.

Eine gesteigerte Reaktivität von Lymphozyten auf Peptid beladenen DC ist durch erhöhte Proliferation, IFN $\gamma$ -Expression und Trogozytose d.h. den Membranaustausch von DC an T-Zellen, nachweisbar. An Hand der Trogozytose kann die Zahl der antigenspezifischen Interaktionen abgeschätzt werden.

Sowohl mit MHC I als auch mit MHC II bindenden K31- bzw. K71-Peptiden beladene DC konnten naive T-Zellen stimulieren. Die Trogozytoserate von K31-I, K31-II, K71-I und K71-II beladenen DC mit naiven T-Zellen war zwei- bis dreimal höher als von unbeladenen DC, besonders reagierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf K31-I und K71-I beladene DC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf K71-II. Naive T-Zellen zeigten eine signifikant gesteigerte Proliferation, wenn sie mit K31-I, K31-II, K71-I und K71-II beladenen DC inkubiert wurden. Ebenso wurde ein erhöhter Anteil IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen festgestellt, wenn die T-Zellen mit K31-I, K31-II und K71-II beladenen DC kokultiviert wurden, jedoch nicht mit K71-I (Abbildung 32).

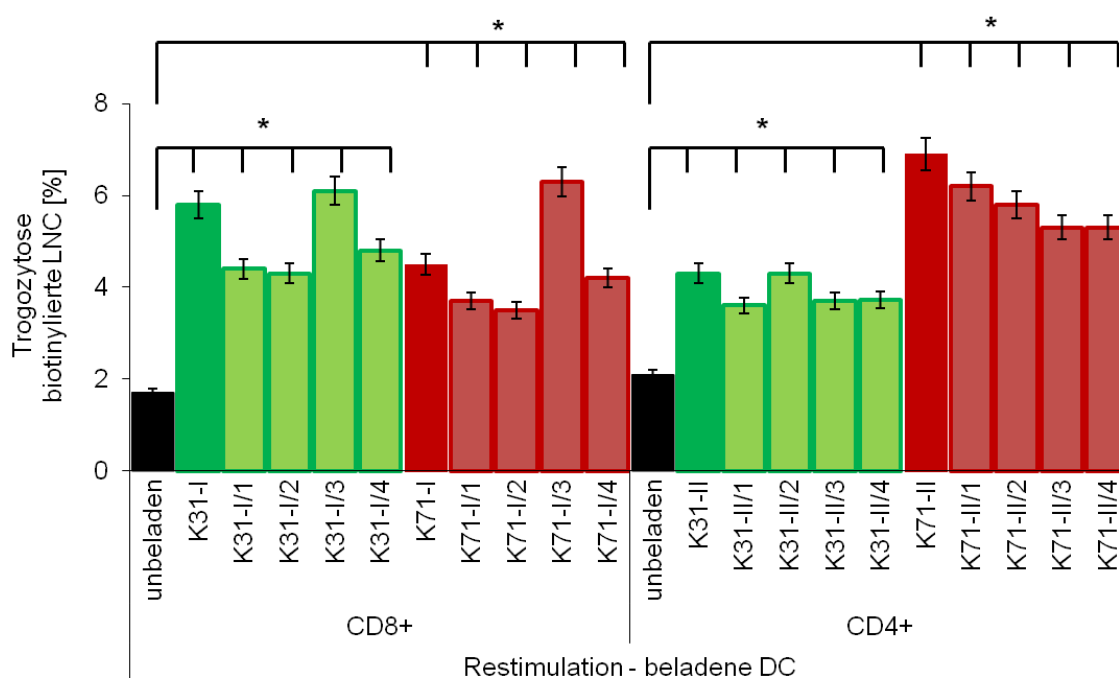




### Abbildung 32: Trogozytose, Proliferation und IFN $\gamma$ -Expression von naiven T-Zellen nach Stimulation mit Peptid-beladenen DC

Aus jungen, naiven C3H/HeJ-Mäusen wurden LNC isoliert und mit DC kokultiviert, die mit MHC I oder MHC II Peptiden der Keratine K31, K32, K35, K82, K85, K71 und K75 beladenen waren. (A) Die DC wurden zuvor biotinyliert und mit den LNC für 2h bei 37°C kokultiviert. Anschließend wurden die LNC mit Streptavidin-APC sowie anti-CD4 bzw. anti-CD8 und Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil biotinylierter CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen. (B) LNC und beladene DC wurden für 48h bei 37°C kokultiviert. <sup>3</sup>H-Thymidin (1 $\mu$ Ci) wurde 16h vor Ablauf der Inkubationszeit zugesetzt. Die Proliferation wurde durch Bestimmung der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation gemessen. (C) LNC und beladene DC wurden für 48h bei 37°C kokultiviert. Anschließend wurden LNC fixiert, permeabilisiert und mit anti-IFN $\gamma$ -Antikörper sowie Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt und durchflusszytometrisch detektiert. (A,B,C) Signifikante Unterschiede zu unbeladenen DC sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Um das potentielle Autoantigen noch genauer zu definieren, wurden naive T-Zellen mit DC stimuliert, die mit K31-I-, K31-II-, K71-I- oder K71-II-Peptiden beladenen waren, und anschließend mit DC restimuliert, die mit individuellen Peptiden beladenen waren (Kx-I/1-4 bzw. Kx-II/1-4). Die Restimulation mit allen individuellen Peptiden zeigte eine zwei- bis dreifach höhere Trogozytoserate der Lymphozyten nach Restimulation. (Abbildung 33).



### Abbildung 33: Trogozytose von *in vitro* restimulierten T-Zellen aus naiven Mäusen mit Peptid beladenen DC

Aus jungen C3H/HeJ-Mäusen wurden LNC isoliert mit Peptid-Mix beladenen DC stimuliert (7d, 37°C), mit Einzelpeptid beladenen DC restimuliert (7d, 37°C) und mit

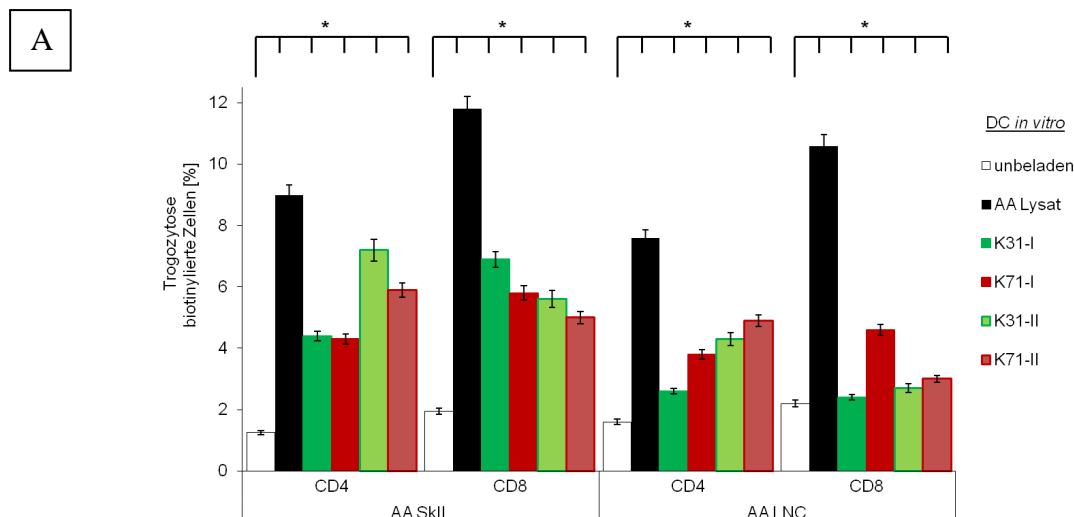
biotinylierten, beladenen DC für 2h bei 37°C kokultiviert. DC waren mit Peptid-Mixen K31-I, K31-II, K71-I oder K71-II aus je 4 Peptiden oder den einzelnen Peptiden beladenen. Anschließend wurden die LNC mit Streptavidin-APC sowie anti-CD4 bzw. anti-CD8 und Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil biotinylierter CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Signifikante Unterschiede zu unbeladenen DC sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

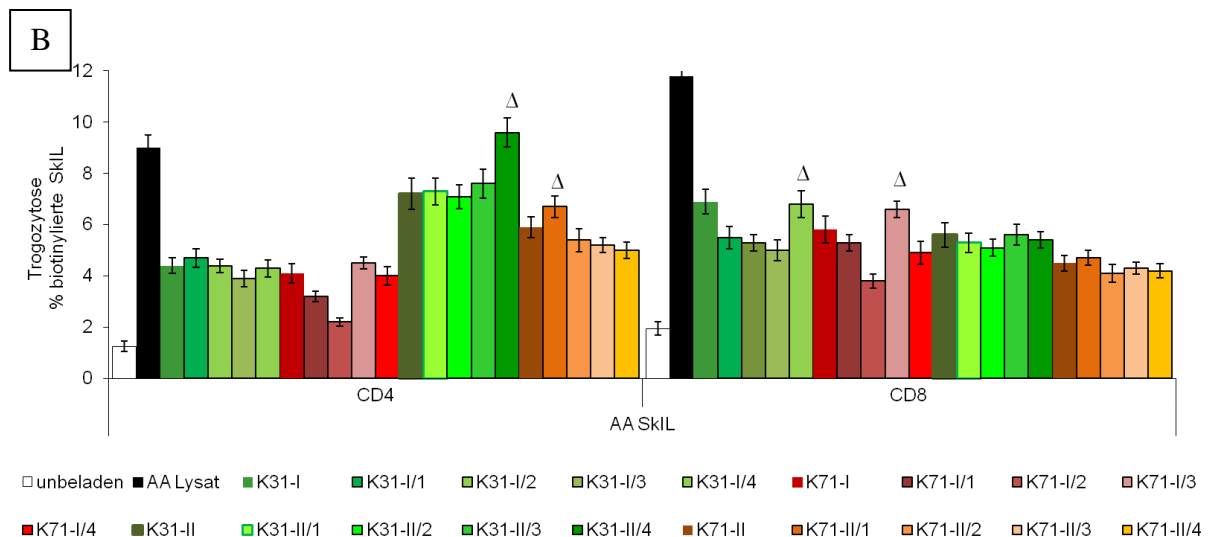
In naiven Lymphozyten von C3H/HeJ-Mäusen, die spontan AA entwickeln können, wurden sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert, die auf die Keratine K31 und K71 reagieren.

### 3.3.2 Keratin-spezifische Effektor-T-Zellen in AA betroffenen Mäusen

Um eine Beteiligung der Keratine K31 und K71 als Autoantigen der AA nachzuweisen, wurden aktivierte Effektor-T-Zellen von AA betroffenen Mäusen analysiert. Die Haut infiltrierende Lymphozyten (Skin infiltrating Lymphocyte, SkIL) sowie Lymphozyten der dränierenden Lymphknoten wurden isoliert und mit Peptid beladenen oder zur Kontrolle mit AA-Haut-Lysat beladenen DC stimuliert.

Reaktive T-Zellen gegen K31-I/ K31-II und K71-I/K71-II wurden durch Trogozytose nachgewiesen. CD4<sup>+</sup> SkIL reagierten besonders stark auf K31-II/4 und K71-II/1 und CD8<sup>+</sup> SkIL auf K31-I/4 und K71-I/3 (Abbildung 34).

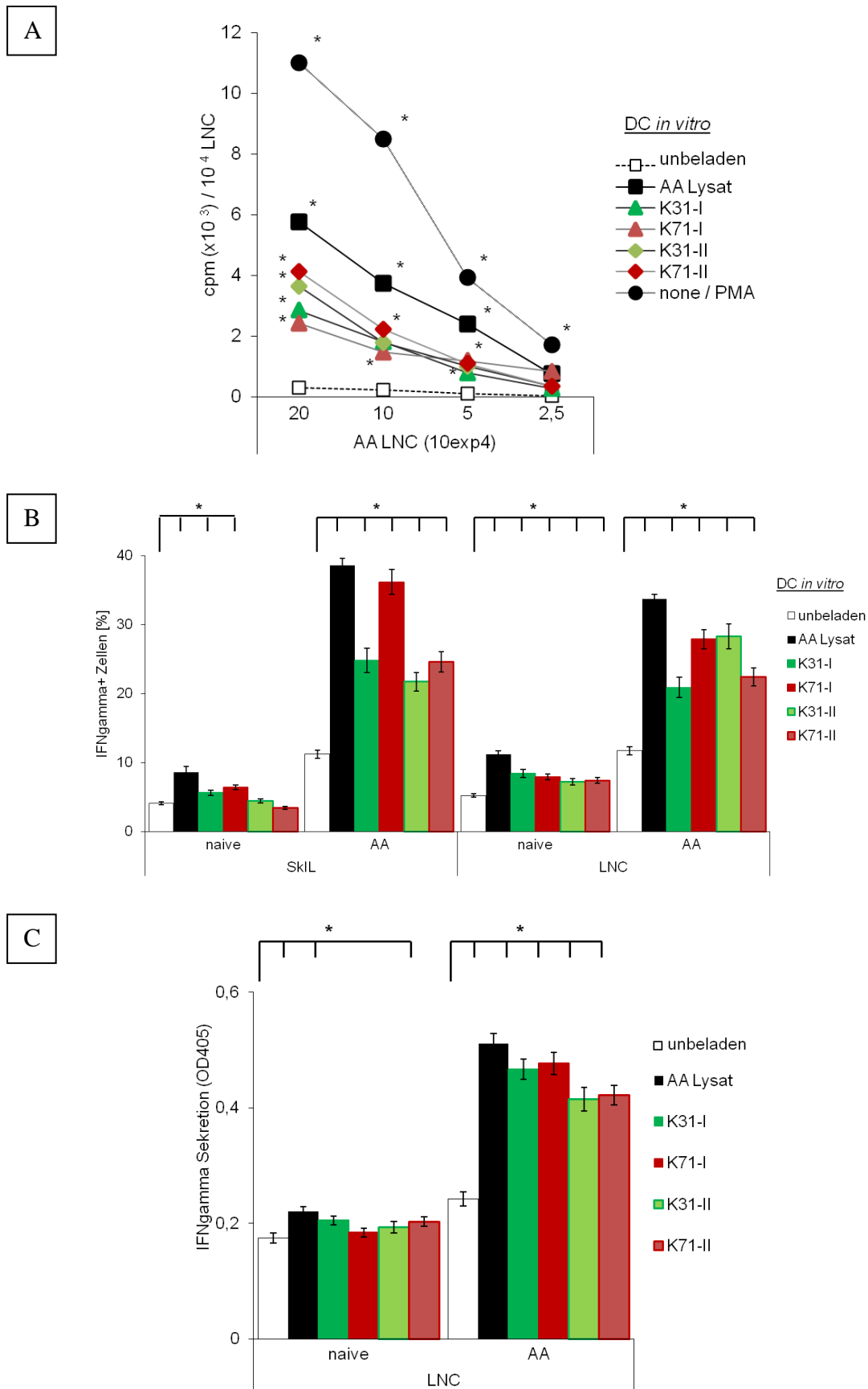




### Abbildung 34: Trogozytose von T-Zellen aus Mäusen mit AA

In jungen C3H/HeJ-Mäusen wurde mittels Hauttransplantation eine AA induziert. Nach Entwicklung einer *Alopecia totalis* wurden SkIL und LNC isoliert und mit biotinylierten, beladenen DC für 2h bei 37°C kokultiviert und anschließend mit Streptavidin-APC und anti-CD4 bzw. anti-CD8 und Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper angefärbt. (A) DC waren mit Peptid-Mixen K31-I, K31-II, K71-I oder K71-II aus je 4 Peptiden oder AA-Lysat beladenen. (B) DC waren mit Peptid-Mixen K31-I, K31-II, K71-I oder K71-II aus je 4 Peptiden, den einzelnen Peptiden oder AA-Lysat beladenen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil biotinylierter CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen (A) Signifikante Unterschiede zu unbeladenen DC sind durch \* gekennzeichnet. (B) Signifikante Unterschiede der Einzelpeptidstimulation zur Stimulation mit dem entsprechenden Peptid-Mix sind durch Δ gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

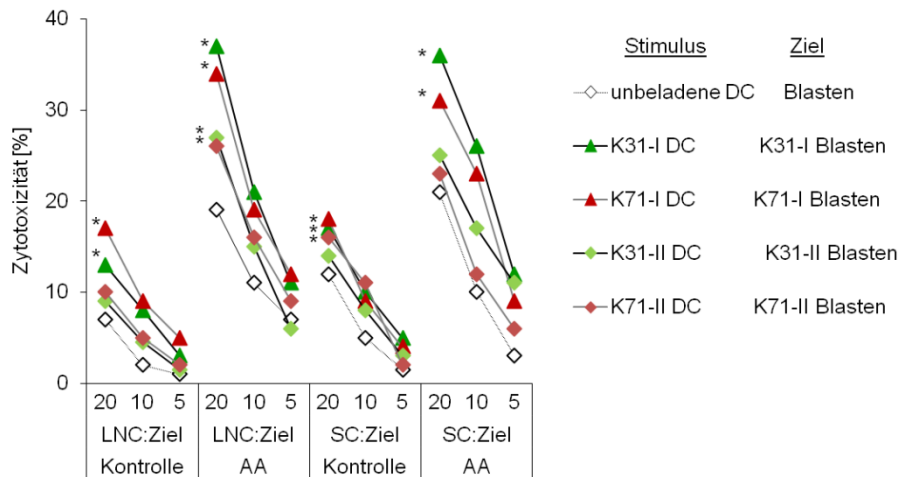
K31-I/K31-II oder K71-I/K71-II beladene DC stimulierten die Lymphozytenproliferation. Allerdings proliferierten T-Zellen am stärksten, wenn sie mit AA-Lysat beladenen DC stimuliert wurden. Weiterhin wurden IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch und in den Überstand sekretiertes IFN $\gamma$  nachgewiesen, wenn die Lymphozyten mit K31-I/K31-II oder K71-I/K71-II beladenen DC stimuliert wurden (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Proliferation und IFN $\gamma$ -Expression von T-Zellen AA betroffener Mäuse nach Stimulation mit Peptid beladenen DC**  
 In jungen C3H/HeJ-Mäusen wurde mittels Hauttransplantation eine AA induziert.

SkIL und LNC wurden isoliert und mit Peptid-beladenen DC für 48h bei 37°C kokultiviert. (A)  $^3\text{H}$ -Thymidin ( $1\mu\text{Ci}$ ) wurde 16h vor Ablauf der Inkubationszeit zugesetzt. Die Proliferation wurde durch Bestimmung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation gemessen. (B) LNC wurden fixiert, permeabilisiert und mit anti-IFN $\gamma$ -Antikörper sowie Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper durchflusszytometrisch detektiert. (C) ELISA-Bestimmung des IFN $\gamma$ -Gehalts in Kokulturüberständen. (A,B,C) Signifikante Unterschiede zu unbeladenen DC sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Effektor-T-Zellen aus naiven Kontrolltieren und von AA betroffenen Tieren wurden mit K31-I, K31-II, K71-I oder K71-II beladenen DC *in vitro* restimuliert und auf ihre zytotoxische Aktivität untersucht. Als Zielzellen dienten entsprechend beladenen T-Zell-Blasten. Die höchste Zytotoxizität wurde nach Restimulation mit K31-I und K71-I in naiven und AA LNC und Milzzellen (*Spleen cell*, SC) detektiert. AA LNC zeigten ebenfalls zytotoxische Aktivität gegen K31-II und K71-II beladenen Zielzellen (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Zytotoxische T-Zellen AA betroffener Mäuse nach Stimulation mit Peptid beladenen DC**

Dränierende LNC und SC aus naiven (Kontrolle) und AA betroffenen C3H/HeJ-Mäusen wurden *in vitro* mit DC restimuliert, die mit K31/I, K31/II, K71/I oder K71/II beladen wurden. Anschließend wurden die LNC im angegebenen Verhältnis mit  $^3\text{H}$ -Thymidin-markierte Zielzellen (unbeladene oder mit Peptid beladene T-Zell-Blasten) ausgesät und für 6h inkubiert. Die Radioaktivität wurde im  $\beta$ -Zähler detektiert und die % Zytotoxizität berechnet. Signifikante Unterschiede zu unbeladenen Zielzellen sind mit \* gekennzeichnet. Mittelwerte von Triplikaten sind gezeigt.

Autoreaktive T-Zellen gegen die Keratine K31 und K71 wurden in der Haut, den dränierenden Lymphknoten und der Milz von AA betroffenen C3H/HeJ-Mäusen nachgewiesen.

### 3.3.3 Induktion der Alopecia areata in C3H/HeJ-Mäusen durch DC-Vakzinierung mit K31 und K71 Peptiden

Nachdem K31 und K71 reaktive T-Zellen in naiven und von AA betroffenen Mäusen nachgewiesen werden konnten, wurde untersucht, ob AA in naiven C3H/HeJ-Mäusen mittels DC-Vakzinierung induziert werden kann.

Pro Gruppe wurden 5 jungen, gesunden Mäusen wöchentlich K31-I/II (Mix aus 8 Peptiden) oder K71-I/II beladene DC subkutan injiziert.

Die K71-I/II vakzinierten Mäuse zeigten bereits nach 6 Wochen Fellveränderungen mit ergrauendem, kurzem Haar im unteren Rückenbereich. Die AA entwickelte sich progressiv, sodass nach 10 Wochen bereits alle Mäuse dieser Gruppe kompletten Haarausfall um die Schnauze und die Extremitäten sowie teilweise am Bauch zeigten.

In der K31-I/II-Gruppe trat AA im Vergleich zu K71-I/II um 2 Wochen verzögert auf und der Verlauf schritt langsamer voran, aber alle Mäuse zeigten kompletten Haarausfall an der Schnauze, 3 von 5 Mäusen entwickelten partielle AA an den Extremitäten und am Bauch (Abbildung 37).

A

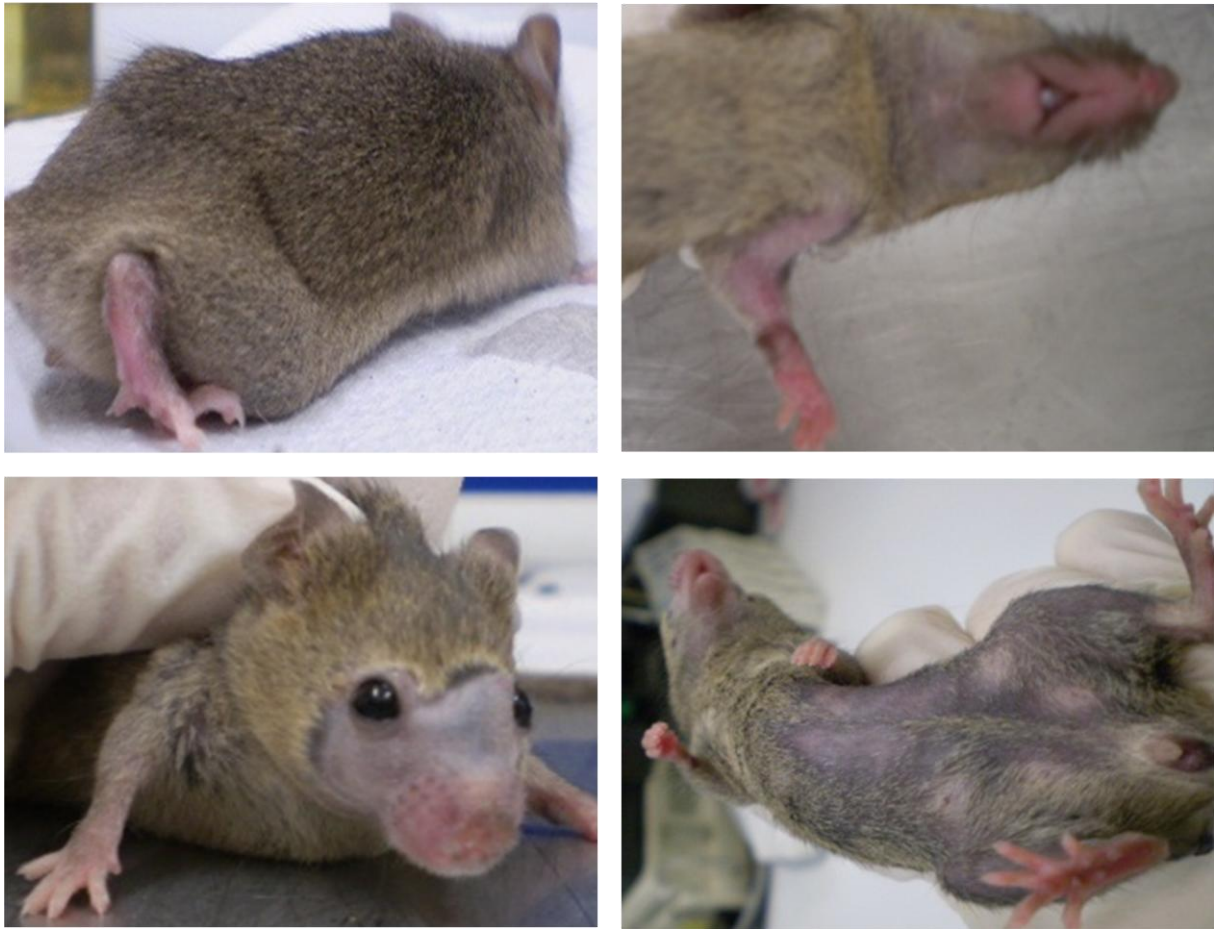
DC-K31 I+II: 12 Wochen





B

DC-K71 I+II: 8 Wochen



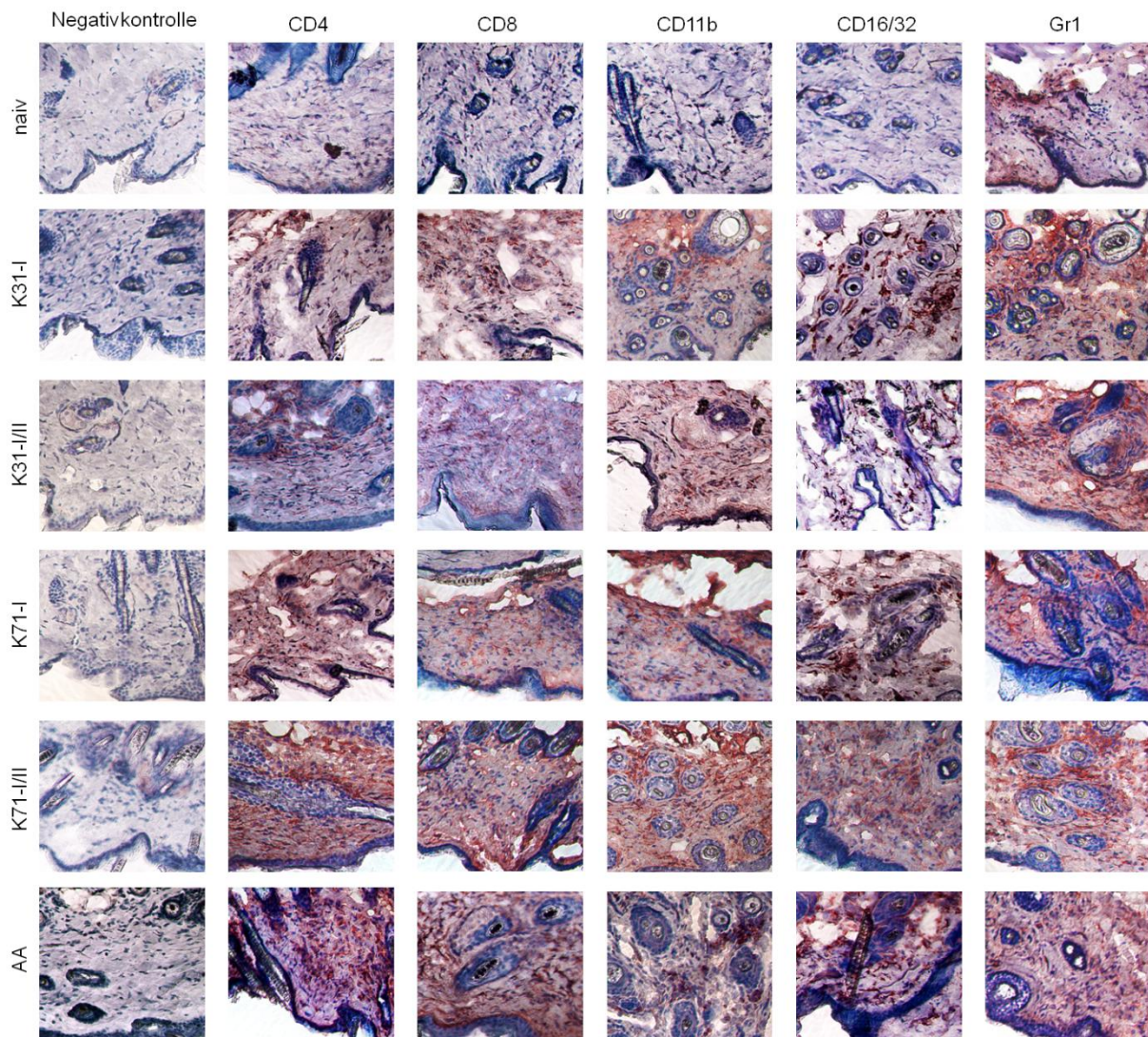
**Abbildung 37: Progression der AA nach DC-Vakzinierung**

Junge C3H/HeJ-Mäuse erhielten wöchentlich eine subkutane Injektion von  $2 \times 10^6$  DC, die mit MHC I und MHC II Peptiden der Keratine (A) K31 oder (B) K71 beladen waren. Gezeigt sind repräsentative Beispiele des Haarausfalls.

In einem zweiten Versuch wurden die Mäuse mit DC vakziniert, die entweder mit MHC I (Mix aus 4 Peptiden) oder mit MHC II Peptiden beladenen waren. Die Vakzinierung mit K31-I beladenen DC verlief bezogen auf Auftreten der AA und progressiven Verlauf ähnlich wie zur Vakzinierung mit K31-I/II beladenen DC. Die Progression im Falle der Vakzinierung mit K71-I beladenen DC war schwächer im Vergleich zu K71-I/II. Nur die Hälfte der Mäuse zeigte kompletten Haarausfall an der Schnauze und den Extremitäten. Die Vakzinierungen mit K31-II oder K71-II beladenen DC zeigten nur schwache Effekte wie Fellveränderungen zu kürzerem, ergrauendem Haar an der Schnauze und den Extremitäten und lokaler Haarausfall an der Injektionsstelle.



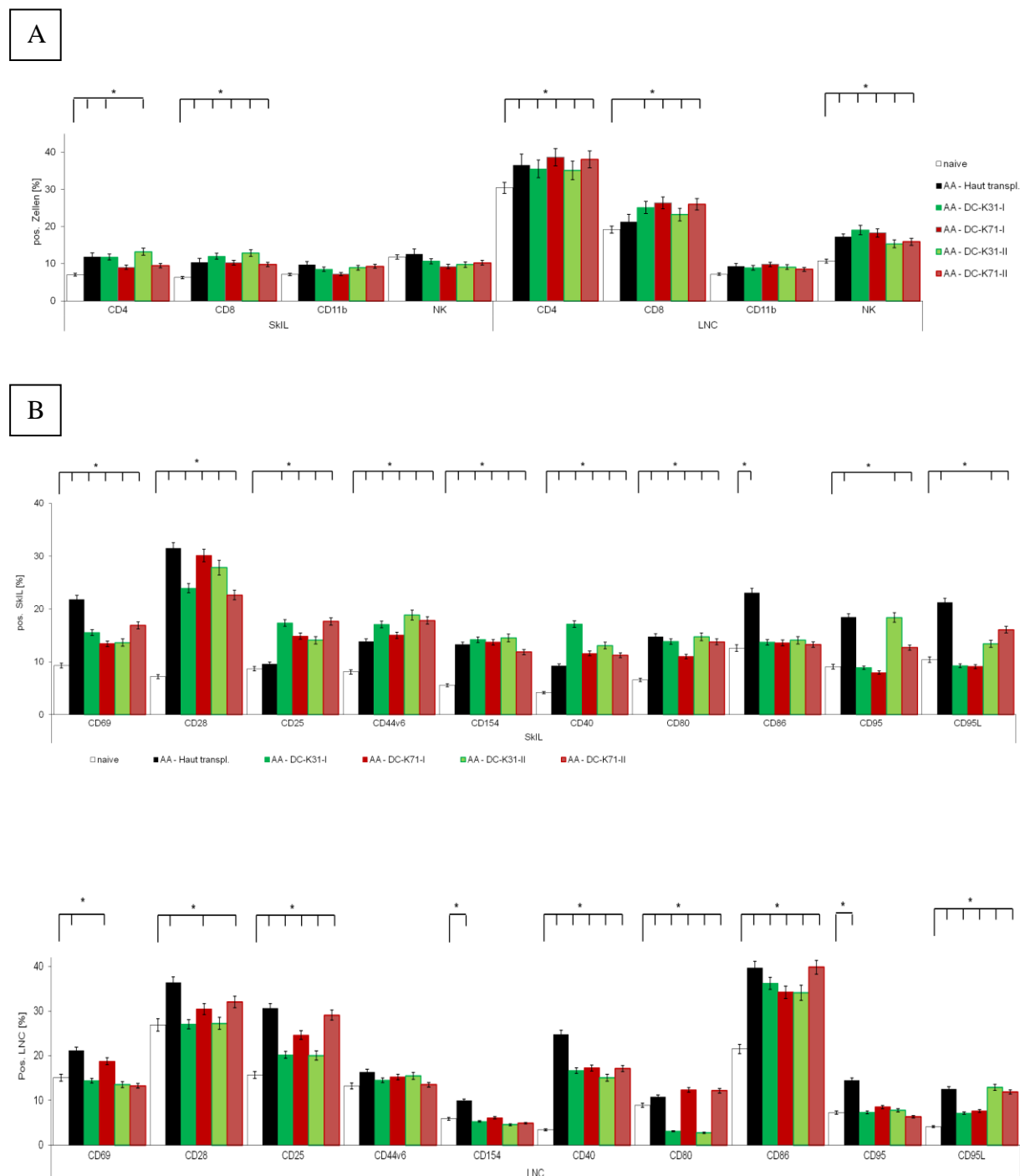
In immunhistologischen Schnitten der betroffenen Hautareale nach der K31-I/II bzw. K71-I/II DC-Vakzinierung waren in beiden Gruppen für AA typische infiltrierende  $CD8^+$ ,  $CD4^+$  T-Zellen und Makrophagen ( $CD11b^+$ ) um zerstörte Haarfollikel nachgewiesen. In der K71-I/II Gruppe wurden mehr  $CD4^+$  T-Zellen als in K31-I/II detektiert. In den betroffenen Hautarealen beider Gruppen wurden NK-Zellen ( $CD16/32^+$ ) und  $Gr1^+$  Zellen (myeloide Zellen) detektiert. Immunhistologische Untersuchungen der Haut nach Vakzinierung mit MHC I beladenen DC zeigten ebenfalls die Infiltration von  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , Makrophagen, NK- und  $Gr1^+$  Zellen (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Infiltration von Immunzellen in die Haut nach DC-Vakzinierung**

Junge C3H/HeJ-Mäuse erhielten wöchentlich eine subkutane Injektion von  $2 \times 10^6$  DC, die mit MHC I und/oder MHC II Peptiden der Keratine K31 oder K71 beladen waren. Immunhistologische Färbung der Haut aus naiven sowie DC-vakzinierten C3H/HeJ-Mäusen und aus Mäusen, bei denen AA mittels Hauttransplantation induziert wurde.  $7 \mu\text{m}$  dicke Schnitte schockgefrorener Haut wurden mit anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b-, anti-CD16/32, anti-Gr-1- oder Kontroll-IgG-Antikörpern gefärbt (rot) und mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt (blau).

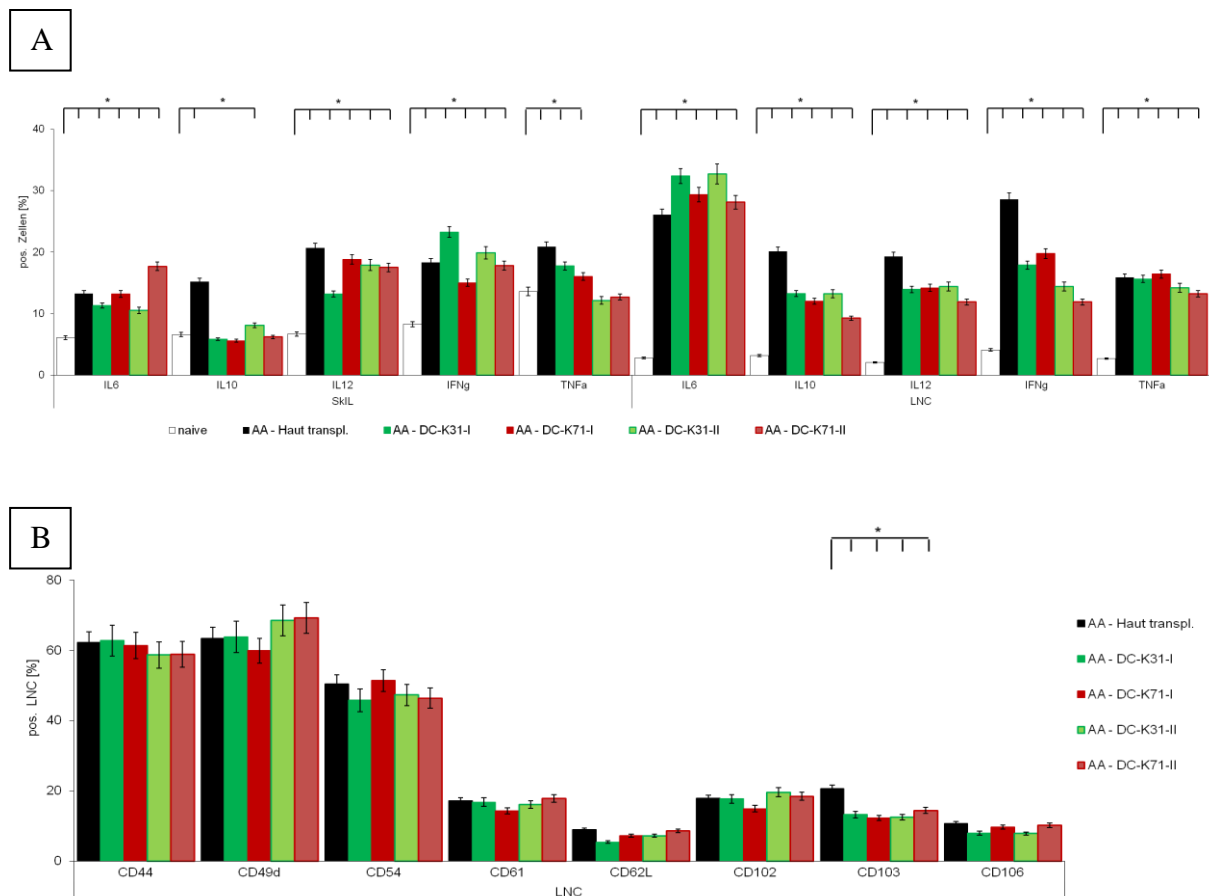
DC-vakzinierter Mäuse zeigte eine stark erhöhte Immunreaktion im Gegensatz zu naiven Mäusen. Diese war mit der Immunreaktion von Mäusen vergleichbar, denen AA mittels Hauttransplantation induziert worden war. Der prozentuale Anteil von T-Zellen in der Haut war um circa 75% erhöht gegenüber naiven Mäusen. Die T-Zell-Aktivierungsmarker CD69, CD25, CD28, CD44v6 und CD154 (CD40L) sowie die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80 wurden in SkIL verstärkt nachgewiesen. In dränierenden LNC wurden vermehrt CD25, CD40 und CD86 exprimiert. CD95L konnte nur in K31-II oder K71-II vakzinierter und transplantierten C3H/HeJ-Mäusen detektiert werden (Abbildung 39).



### Abbildung 39: Anteil der Immunzellen und Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker in SkIL und LNC

Junge C3H/HeJ-Mäuse erhielten wöchentlich eine subkutane Injektion von  $2 \times 10^6$  DC, die mit MHCI oder MHC II Peptiden der Keratine K31 oder K71 beladen waren. Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver SkIL und LNC, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit Antikörpern gegen (A) Immunzell-Subpopulationen, (B) T-Zell-Aktivierungsmarkern sowie kostimulatorische Moleküle und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. Signifikante Unterschiede zu naiven SkIL bzw. LNC sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Das Zytokinprofil der SkIL und LNC aus DC-vakzinierter Mäusen war mit dem der transplantierten Mäuse vergleichbar. Ausnahmen waren die Expression von IL10 in SkIL der K31-I, K31-II und K71-II vakzinierter Gruppen, die auf dem niedrigem Expressionsniveau der naiven Mäuse blieb, und TNF $\alpha$  in K31-II bzw. K71-II vakzinierter Mäusen, das ebenfalls auf dem Niveau der naiven Mäuse war. In LNC DC-vakzinierter Mäuse wurde bis auf CD103, das schwächer exprimiert wurde, das gleiche Expressionsmuster an Adhäsionsmolekülen detektiert wie in transplantierten Mäusen (Abbildung 40).

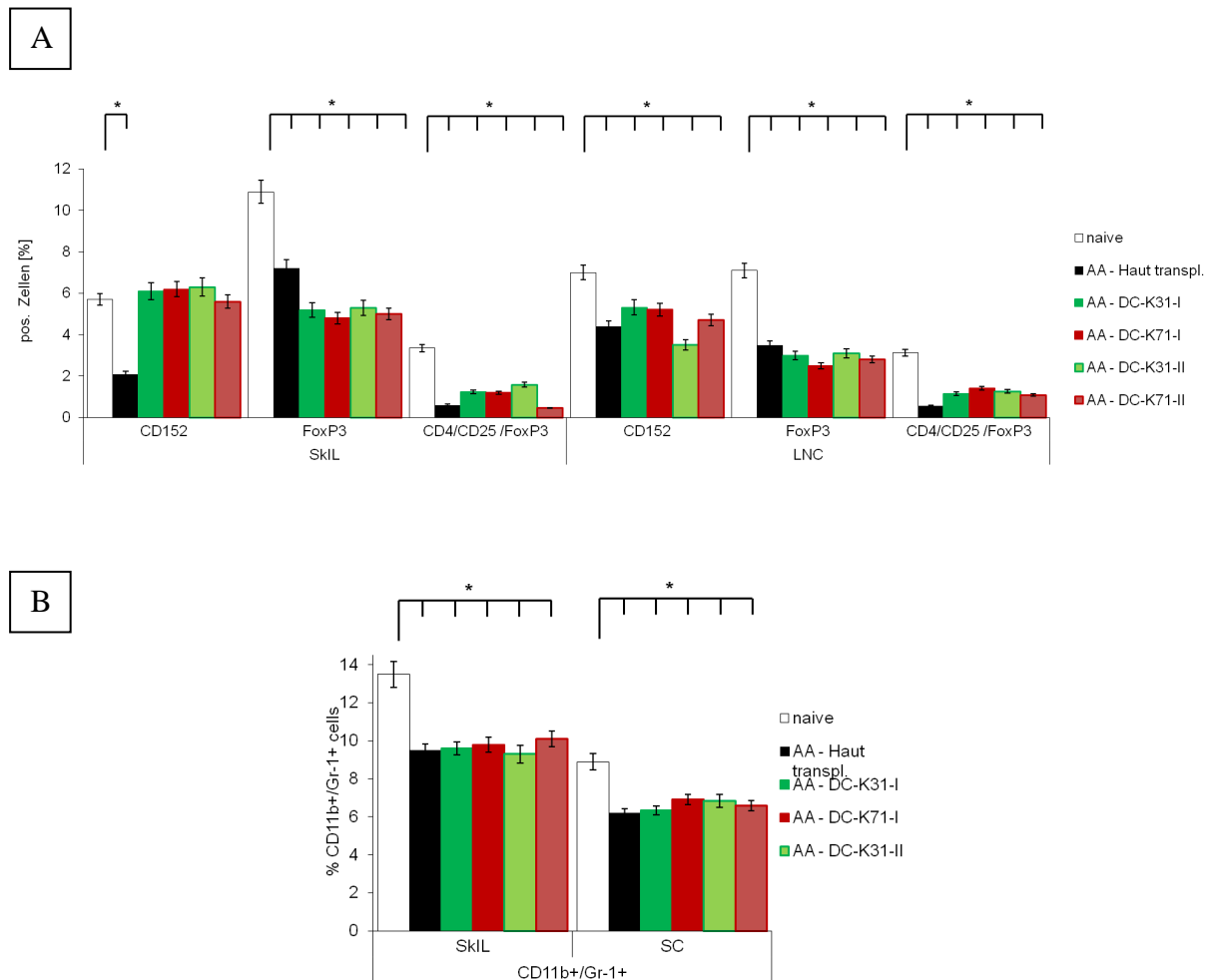


### Abbildung 40: Expression von Zytokinen in SkIL und LNC sowie von Adhäsionsmolekülen in LNC

Junge C3H/HeJ-Mäuse erhielten wöchentlich eine subkutane Injektion von  $2 \times 10^6$  DC,

die mit MHC I oder MHC II Peptiden der Keratine K31 oder K71 beladen waren. Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver SkIL und LNC, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit Antikörpern gegen (A) Zytokine, (B) Adhäsionsmoleküle und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. (A) Signifikante Unterschiede zu naiven SkIL bzw. LNC sind durch \* gekennzeichnet. (B) Signifikante Unterschiede zu LNC aus transplantierten Mäusen sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Die Expression von CD152 (CTLA4) war in SkIL und LNC hauttransplantiertter Mäuse und in den LNC DC-vakzinierter Mäuse deutlich niedriger als in naiven Mäusen. Der Anteil an  $T_{reg}$  ( $CD4^+$ ,  $CD25^+$ ,  $FoxP3^+$ ) in SkIL und LNC hauttransplantiertter Mäuse und DC-vakzinierter Mäuse war reduziert im Vergleich zu naiven Mäusen. Weiterhin waren sowohl in DC-vakzinieren als auch in hauttransplantierten Mäusen weniger myeloide Suppressorzellen (MDSC;  $CD11b^+$   $Gr1^+$  Zellen) nachweisbar als in naiven Mäusen (Abbildung 41).



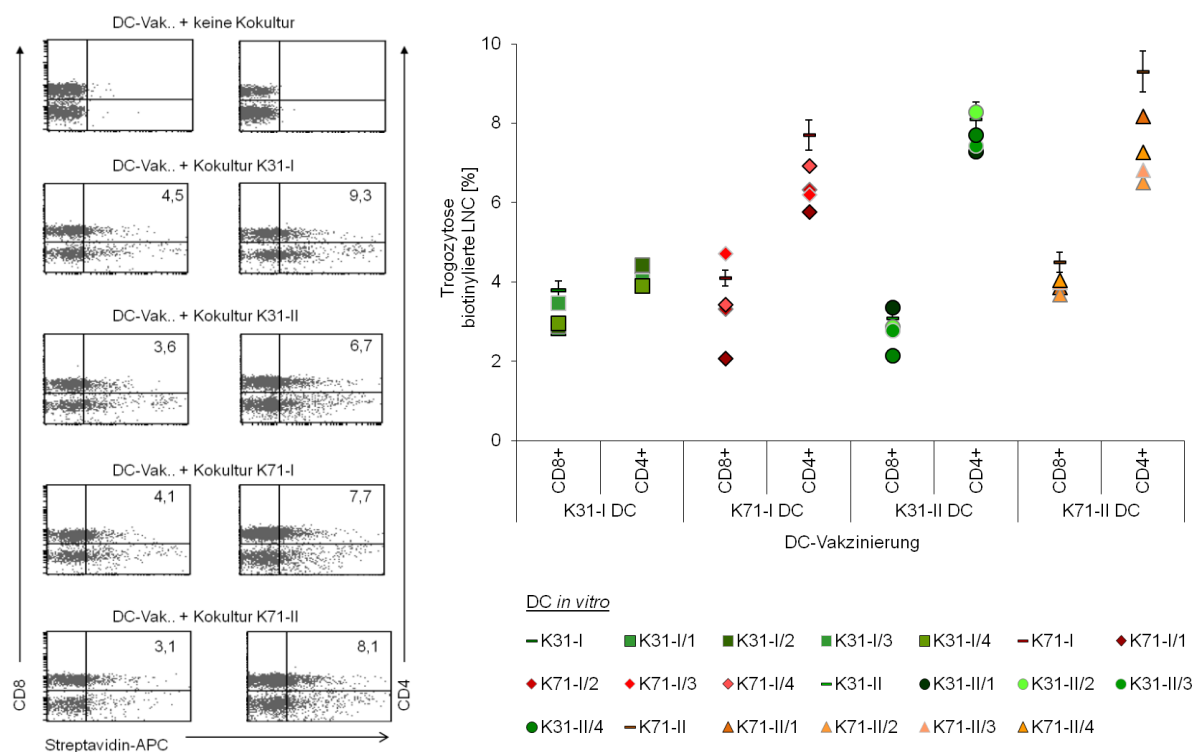
**Abbildung 41: Anteil von regulatorischen T-Zellen und MDSC in SkIL, LNC und SC**

Junge C3H/HeJ-Mäuse erhielten wöchentlich eine subkutane Injektion von  $2 \times 10^6$  DC, die mit MHC I oder MHC II Peptiden der Keratine K31 oder K71 beladen waren. (A) Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver SkIL und LNC, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit Antikörpern gegen CD152



und T<sub>reg</sub>-Marker und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. (B) Dargestellt ist der prozentuelle Anteil von MDSC (CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> Zellen) in SkIL und SC, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit Antikörpern gegen CD11b und Gr1 und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. (A,B) Signifikante Unterschiede zu naiven Zellen sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

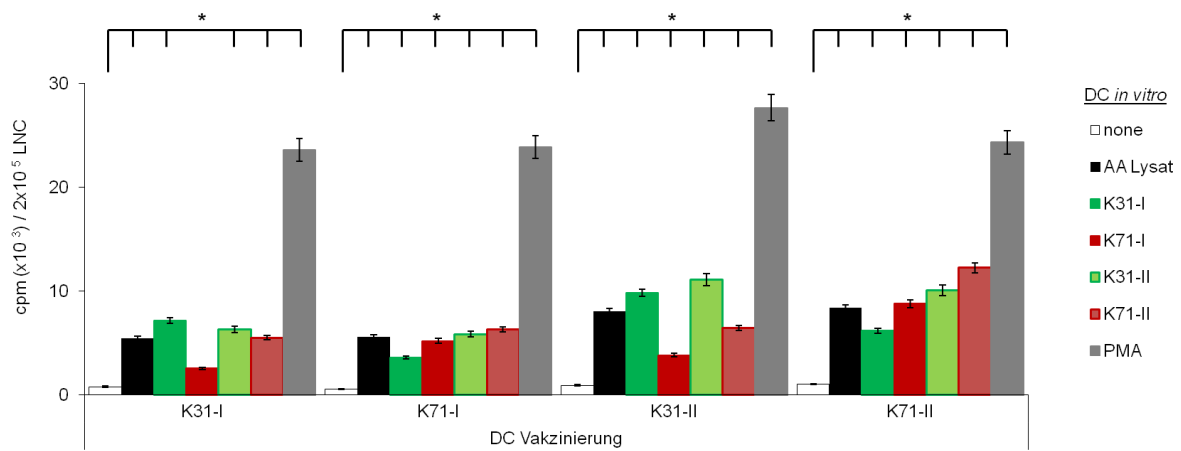
Die dränierenden LNC DC-vakzinierter Mäuse zeigten nach *in vitro* Restimulation mit K31-I, K31-II, K71-I oder K71-II Peptiden bzw. mit den individuellen Peptiden beladenen DC eine verstärkt Trogozytoserate. Die Trogozytoserate nach Restimulation mit individuellen Peptiden waren mit denen der Peptidmixe vergleichbar und die Unterschiede zwischen den Einzelpeptiden waren gering (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Trogozytose von T-Zellen aus DC-vakzinierter Mäuse mit Peptid beladenen DC**  
 Junge C3H/HeJ-Mäuse erhielten wöchentlich eine subkutane Injektion von  $2 \times 10^6$  DC, die mit MHC I oder MHC II Peptiden der Keratine K31 oder K71 beladen waren. Dränierende LNC wurden isoliert und mit biotinylierten, beladenen DC für 2h bei 37°C kokultiviert. DC waren mit MHC I oder MHC II Peptiden der Keratine K31 bzw. K71 oder den einzelnen Peptiden beladenen. Anschließend wurden die LNC mit Streptavidin-APC und anti-CD4 bzw. anti-CD8 und Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil biotinylierter CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

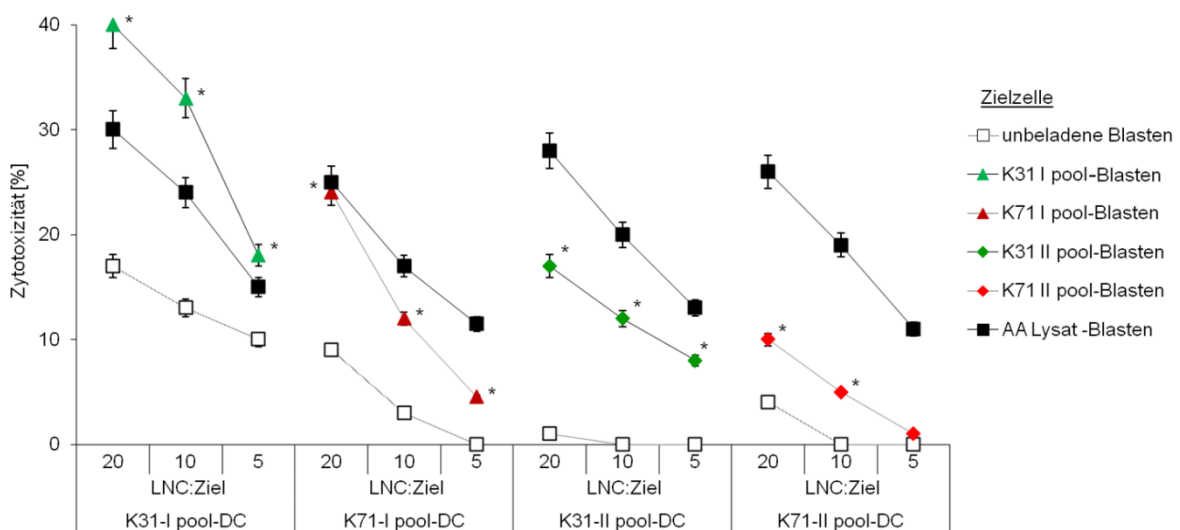
Nach *in vitro* DC-Restimulation proliferierten die dränierenden LNC DC-vakzinierter Mäuse am stärksten, wenn sie mit den Peptiden der Vakzinierung restimuliert wurden. Nach

Restimulation mit DC, die mit anderen Peptiden oder AA-Lysat beladen waren, das als Antigen-Surrogat diente, wurde schwächere Proliferation beobachtet (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Proliferation von *in vitro* restimulierten T-Zellen aus DC-vakzinierter Mäuse**  
 Junge C3H/HeJ-Mäuse erhielten wöchentlich eine subkutane Injektion von  $2 \times 10^6$  DC, die mit MHC I oder MHC II Peptiden der Keratine K31 oder K71 beladen waren. Dränierende LNC wurden isoliert und mit beladenen DC für 48h bei  $37^\circ\text{C}$  restimuliert.  $^3\text{H}$ -Thymidin ( $1 \mu\text{Ci}$ ) wurde 16h vor Ablauf der Inkubationszeit zugesetzt. Die Proliferation wurde durch Bestimmung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation gemessen. Signifikante Unterschiede zu unbeladenen DC sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

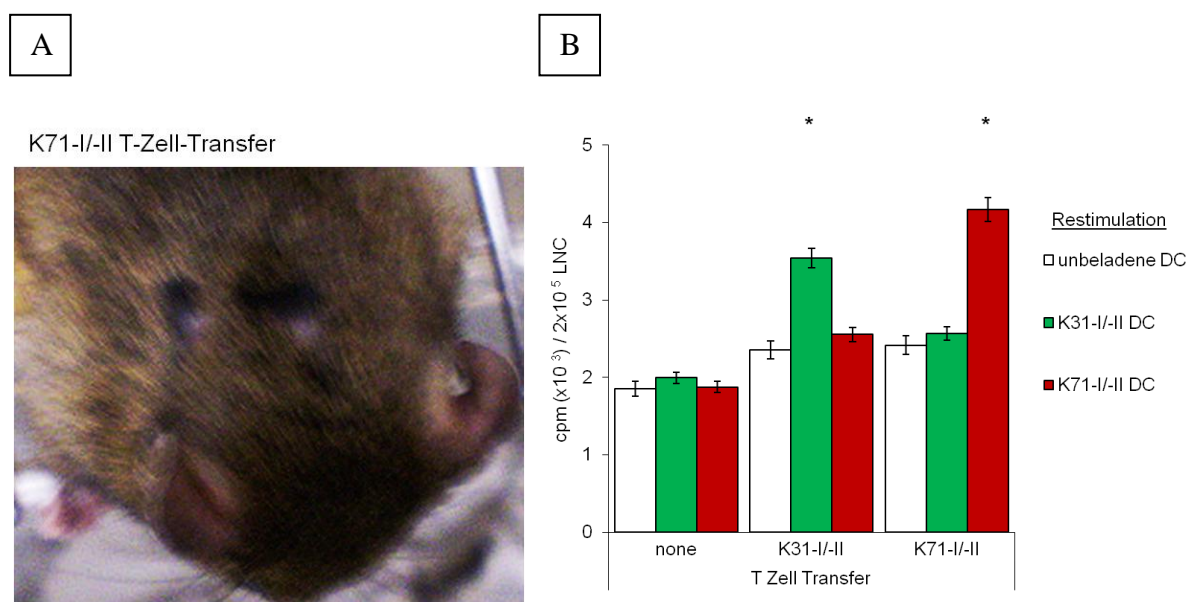
Die zytotoxische Aktivität der dränierenden LNC DC-vakzinierter Mäuse gegen Peptid beladene Zielzellen war stark erhöht im Vergleich zu unbeladenen Zielzellen, aber nur im Falle von LNC K31-I vakzinierter Mäuse war die zytotoxische Aktivität gegen K31-I beladene Zielzellen höher als gegenüber AA-Lysat beladener Zielzellen (Abbildung 44).

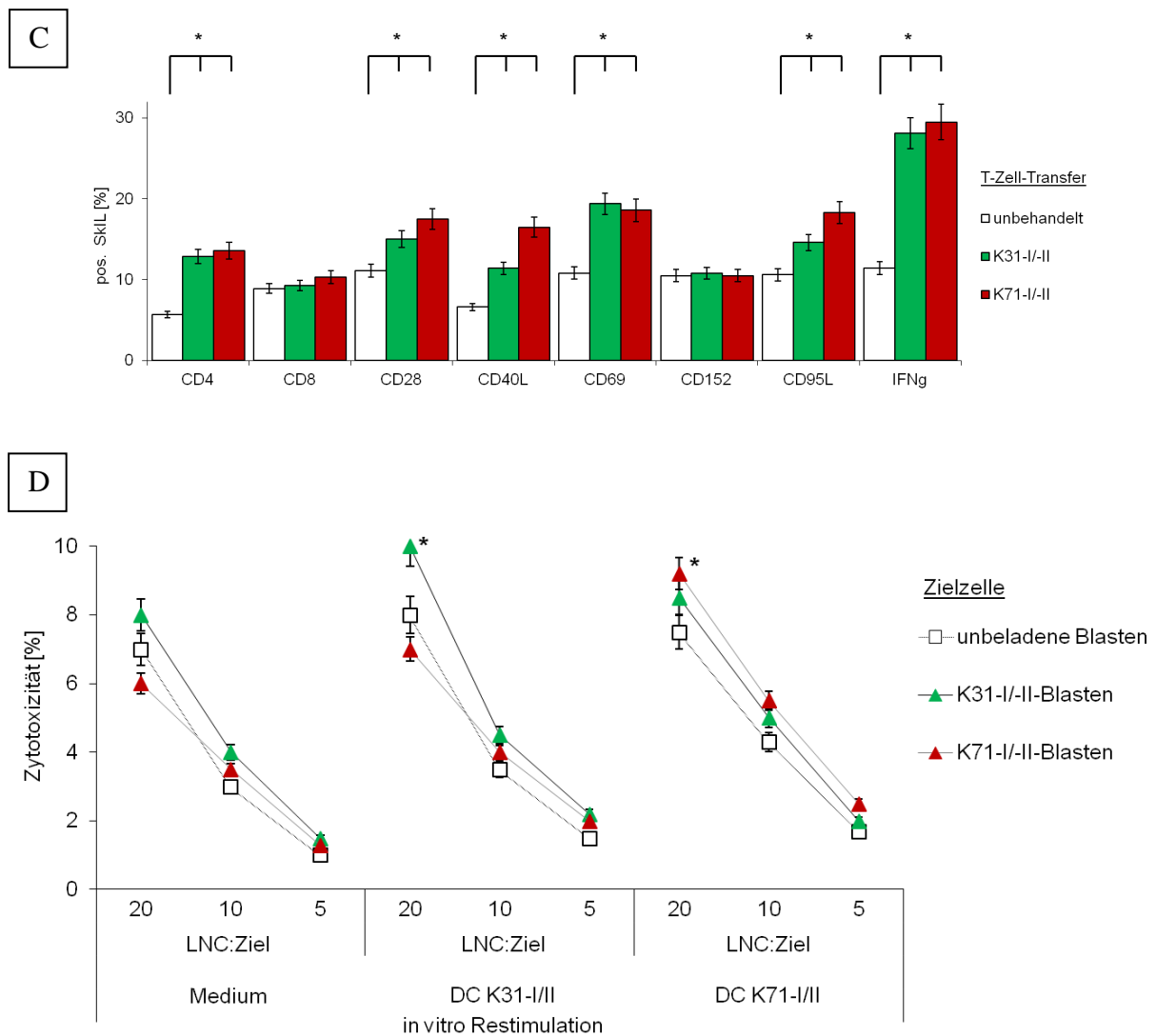


**Abbildung 44: Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen nach DC-Vakzinierung**

Junge C3H/HeJ-Mäuse erhielten wöchentlich eine subkutane Injektion von  $2 \times 10^6$  DC, die mit MHC I oder MHC II Peptiden der Keratine K31 oder K71 beladen wurden. Die LNC wurden isoliert und *in vitro* mit entsprechend beladenen DC restimuliert. Anschließend wurden die LNC im angegebenen Verhältnis mit  $^3\text{H}$ -Thymidin-markierte Zielzellen (unbeladene, mit Peptid oder AA-Lysat beladene T-Zell-Blasten) ausgesät und für 6h inkubiert. Die Radioaktivität wurde im  $\beta$ -Zähler detektiert und die % Zytotoxizität berechnet. Signifikante Unterschiede zu unbeladenen Zielzellen sind mit \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Ein wichtiges Kriterium zur Immunogenität von Autoantigenen ist die Übertragbarkeit der Krankheit in gesunde Empfänger mittels T-Zell-Transfer. Die Induzierbarkeit von AA durch dränierende LNC aus K31-I/II oder K71-I/II Peptid-vakzinierten Mäusen wurde getestet. Die einmalige subkutane Injektion dieser LNC induzierte lokalen Haarausfall um die Injektionsstelle nach etwa 6 bis 8 Wochen, aber keine fortschreitende AA. In *ex vivo* Analysen wurde im Vergleich zu unbehandelten C3H/HeJ-Mäusen eine Anreicherung von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen in den SkIL und eine erhöhte Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker CD69, CD28 und CD40L festgestellt. Die Expression von die CD95L und  $\text{IFN}\gamma$  war gesteigert. Aus den Transfergruppen proliferierten die dränierenden LNC verstärkt, wenn sie mit DC restimuliert wurden welche mit Peptid-beladenen waren, mit denen auch die AA-Induktion erfolgt war. Die zytotoxische Aktivität der dränierenden LNC gegenüber Zielzellen, die mit Peptiden der AA-Induktion beladenen waren, war im Vergleich zu unbeladenen Zielzellen signifikant erhöht. Keine Steigerung wurde zwischen unbeladenen oder mit Peptiden der anderen Gruppe beladenen Zielzellen beobachtet (Abbildung 45).





#### Abbildung 45: Induktion von AA nach T-Zell-Transfer in naiven C3H/HeJ-Mäusen

Naiven C3H/HeJ-Mäusen wurden  $2 \times 10^7$  LNC subkutan injiziert, die aus Mäusen isoliert wurden, die mit K31-I/II oder K71-I/II beladenen DC vakziniert worden waren. (A) Gezeigt ist ein repräsentatives Foto des Haarausfalls. (B) Dränierende LNC wurden isoliert und mit beladenen DC für 48h bei 37°C restimuliert.  $^3\text{H}$ -Thymidin ( $1 \mu\text{Ci}$ ) wurde 16h vor Ablauf der Inkubationszeit zugesetzt. Die Proliferation wurde durch Bestimmung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation gemessen. (C) Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver SkIL, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit Antikörpern gegen T-Zell- sowie Aktivierungsmarker und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. (D) Zytotoxizität von dränierenden LNC, die *in vitro* mit entsprechenden DC restimuliert wurden. Anschließend wurden die LNC im angegebenen Verhältnis mit  $^3\text{H}$ -Thymidin-markierte Zielzellen (unbeladene oder mit Peptid beladene T-Zell-Blasten) ausgesät und für 6h inkubiert. Die Radioaktivität wurde im  $\beta$ -Zähler detektiert und die % Zytotoxizität berechnet. (B,C) Signifikante Unterschiede zu unbeladenen DC sind durch \* gekennzeichnet. (D) Signifikante Unterschiede zu unbeladenen Zielzellen sind mit \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

C3H/HeJ-Mäuse entwickeln nach DC-Vakzinierung mit MHC I und MHC II Peptiden der Keratine K31 und K71 eine milde Form der AA. Durchflusszytometrische und immunhistolo-

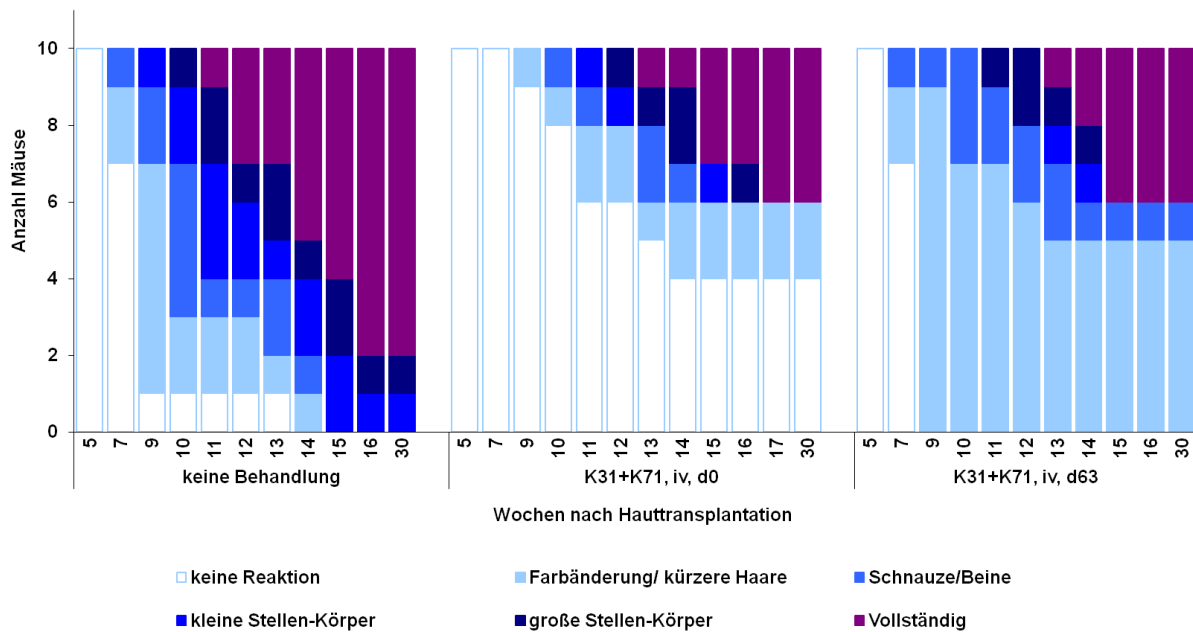


gische Analysen zeigten die Beteiligung von Immunzellen, besonders T-Zellen, an der Haarfollikelattacke und eine vergleichbare T-Zell-Aktivierung wie in AA, die mittels Hauttransplantation induziert wurde. Eine Progression zu *Alopecia totalis* wurde nicht beobachtet. Die DC-Vakzinierung mit MHC I Peptiden zeigte eine schwächere AA-Induktion im Vergleich zur Verwendung MHC I und MHC II bindender Peptide. Die DC-Vakzinierung mit MHC II Peptiden die schwächsten Effekte auf die AA-Progression.

### **3.4 Peptide der Keratine K31 und K71 können erfolgreich zur Autoantigen-spezifischen Therapie der AA eingesetzt werden**

Peptide sind in der Regel nicht immunogen, wenn sie in wässrigen Lösungen verabreicht werden und können immunsuppressiv wirken. Es wurde in hauttransplantierten C3H/HeJ-Mäusen untersucht, ob K31-I/II- zusammen mit K71-I/II-Peptiden die Induktion oder Progression der AA beeinträchtigen. Zwei Mausgruppen wurden wöchentlich 100µg K31-I/II- und K71-I/II-Peptide in physiologischer Kochsalzlösung intravenös injiziert. Die erste Gruppe erhielt die Injektionen direkt nach der Hauttransplantation (K31+K71 Peptide, iv (d0)), die zweite nachdem die Mäuse eine milde Form der AA (K31+K71 Peptide, iv (d63)) entwickelt hatten.

Unbehandelt zeigten acht von 10 Mäusen *Alopecia totalis* und zwei partielle AA 16 Wochen nach der Hauttransplantation. Wenn sie direkt nach der Hauttransplantation mit Peptiden behandelt wurden, entwickelten nur vier von 10 Mäusen *Alopecia totalis*, zwei partielle und vier gar keine AA. Bei Mäusen, bei denen sich bereits eine milde Form der AA entwickelt hatte, als mit der Peptid-Behandlung angefangen wurde, schritt die AA in 5 von 10 Fällen nicht weiter fort. Vier Mäuse entwickelten *Alopecia totalis* und eine partielle AA. Nach Absetzung der Peptid-Behandlung (16. Woche) schritt die AA im Beobachtungszeitraum von insgesamt 30 Wochen nicht weiter fort (Abbildung 46).



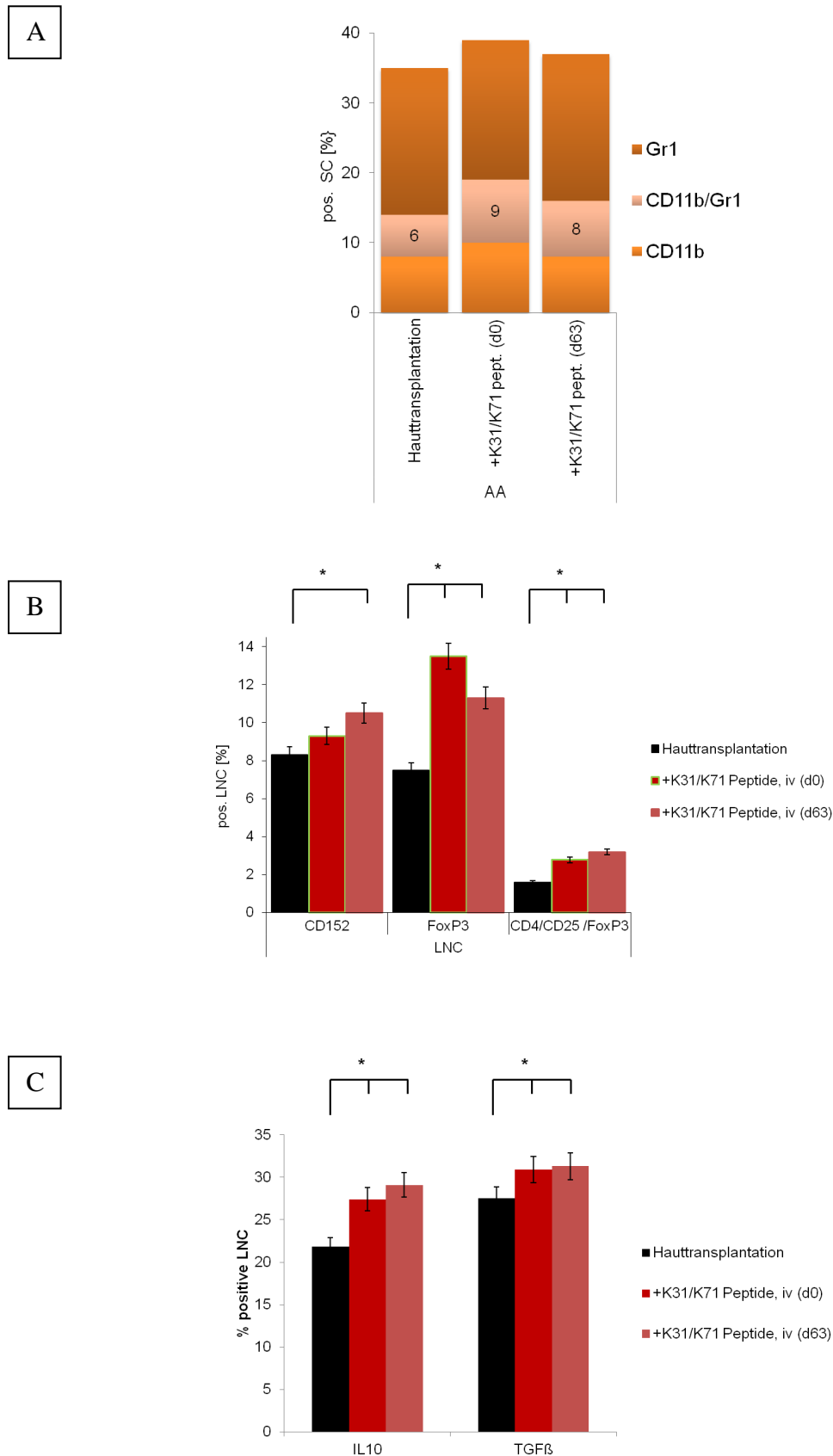
**Abbildung 46: Entwicklung der AA nach Hauttransplantation in unbehandelten und Peptid-behandelten C3H/HeJ-Mäusen**

In jungen C3H/HeJ-Mäusen wurde AA mittels Hauttransplantation induziert. Zur Therapie wurden 100µg K31-I/II und K71-I/II Peptide in physiologischer Kochsalzlösung wöchentlich entweder direkt nach der Hauttransplantation (K31+K71, iv (d0)) oder nach Entwicklung einer milden AA (K31+K71, iv (d63)) intravenös injiziert. Die Injektionen wurden in der 16. Woche nach Hauttransplantation abgesetzt. Dargestellt ist der Verlauf der AA einzelner Mäuse über den Beobachtungszeitraum von 30 Wochen.

Um die Wirkungsweise der Peptidbehandlung näher zu charakterisieren, wurden drei C3H/HeJ-Mäuse je Gruppe untersucht. Es wurden Kontrolltiere mit *Alopecia totalis* mit C3H/HeJ-Mäusen, die sofort nach der Hauttransplantation mit Peptiden behandelt wurden und keine AA entwickelten, und C3H/HeJ-Mäuse, die nach der Entwicklung einer milden AA mit Peptiden behandelt wurden und keine weitere Progression zeigten, verglichen.

Dränierende Lymphknoten und die Milz wurden auf das Vorhandensein von MDSC sowie  $T_{reg}$  und die T-Zellen auf Anergie gegenüber K31 und K71 analysiert.

Der Anteil der immunsuppressiven MDSC war nicht verändert, während der Anteil der  $T_{reg}$  und TGF $\beta$  sowie IL10 exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Anteil von MDSC und regulatorischen T-Zellen sowie die Expression suppressiver Zytokine in SC bzw. LNC**

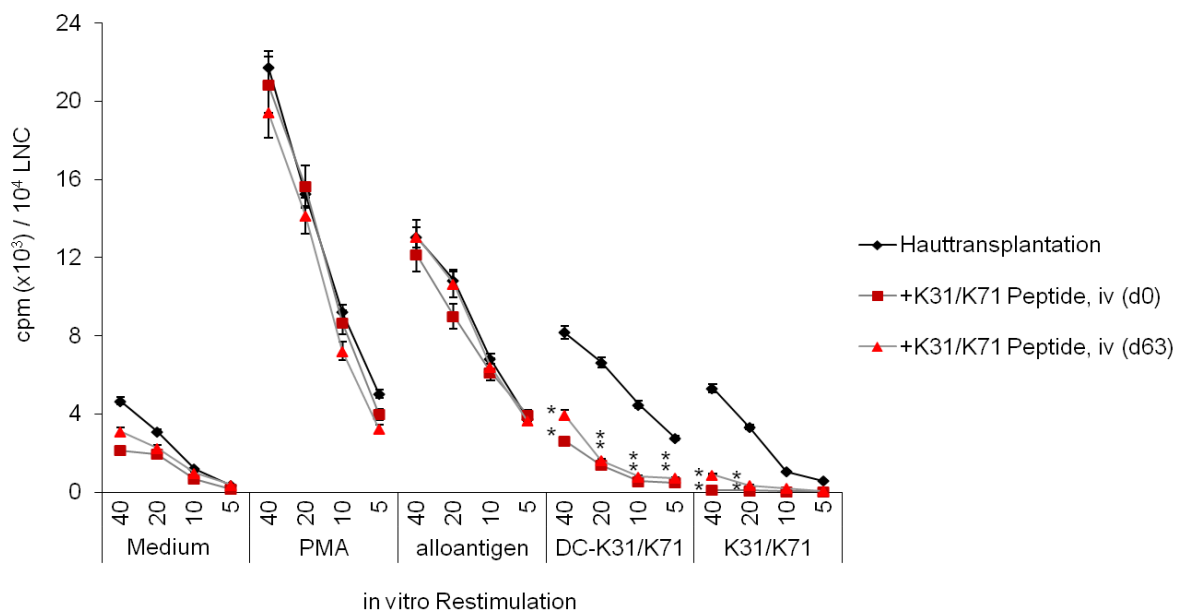
In jungen C3H/HeJ-Mäusen wurde AA mittels Hauttransplantation induziert. Zur Therapie wurden 100µg K31-I/II und K71-I/II Peptide in physiologischer Kochsalzlösung wöchentlich intravenös injiziert. Untersucht wurden C3H/HeJ-Mäuse, die keine AA

entwickelten (K31+K71 Peptide, iv (d0)) bzw. deren milde AA nicht weiter fortschritt (K31+K71, iv (d63)) und Kontrolltiere mit *Alopecia totalis*.

(A) Dargestellt ist der prozentuelle Anteil von MDSC (CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> Zellen) in SC, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit Antikörpern gegen CD11b und Gr1 und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. (B) Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver LNC, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression mit Antikörpern gegen CD152 und T<sub>reg</sub>-Marker und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. (C) Dargestellt ist der prozentuelle Anteil positiver LNC, die für die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen IL10 sowie TGFβ und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper angefärbt wurden. (A, B, C) Signifikante Unterschiede zwischen Peptid-behandelten Mäusen und von *Alopecia totalis* betroffenen Kontrollmäusen sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Zur Demonstration der Anergieinduktion in K31- und K71-spezifischen T-Zellen, wurde die Proliferation, die Trogozytoserate und die Zytotoxizität gegenüber diesen Keratinen gemessen.

Die T-Zellen der Peptid-behandelten Gruppen proliferierten nicht nach *in vitro* Restimulation mit Peptid-beladenen DC oder gelösten Peptiden, aber die Proliferation nach einer allogenen (C57Bl/6-LNC) oder PMA-Stimulation (Phorbol-12-myristat-13-acetat, Positivkontrolle der T-Zell-Aktivierung) wurde nicht beeinträchtigt. Die T-Zellen der Kontrollgruppe proliferierten nach allen *in vitro* Restimulationen (Abbildung 48).

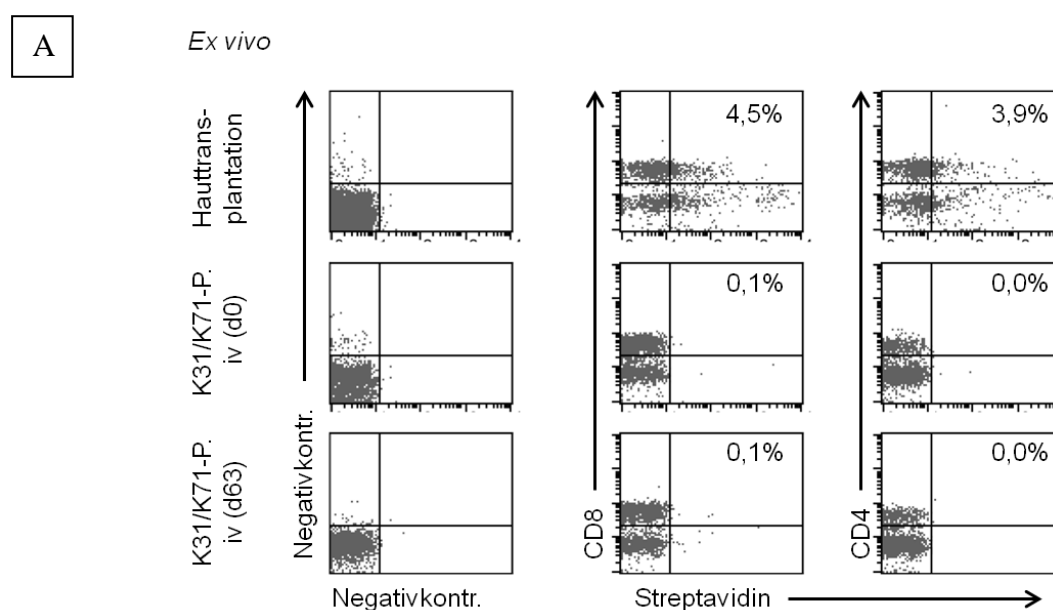


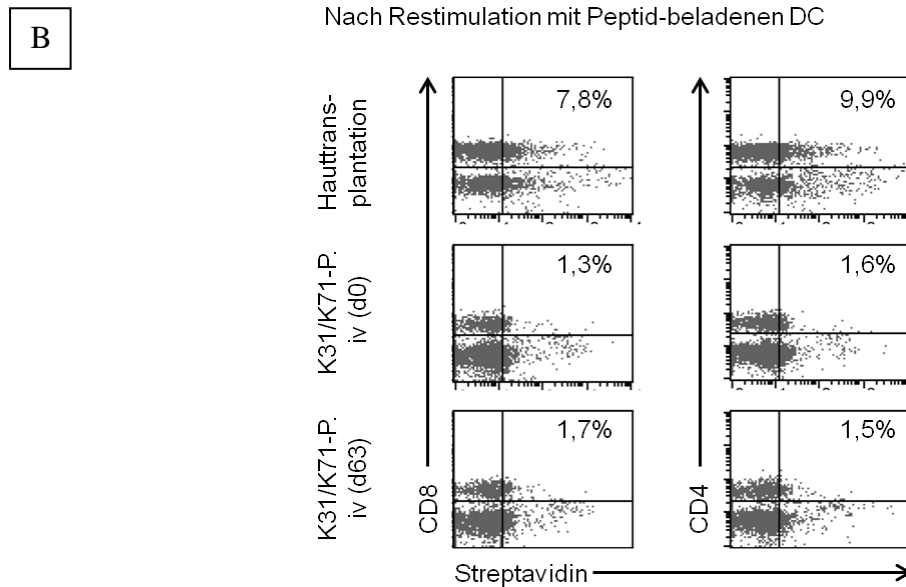
**Abbildung 48: Proliferation von T-Zellen**

In jungen C3H/HeJ-Mäusen wurde AA mittels Hauttransplantation induziert. Zur Therapie wurden 100µg K31-I/II und K71-I/II Peptide in physiologischer Kochsalzlösung wöchentlich intravenös injiziert. Untersucht wurden C3H/HeJ-Mäuse, die keine AA entwickelten (K31+K71 Peptide, iv (d0)) bzw. deren milde AA nicht weiter fortschritt (K31+K71, iv (d63)). Dränierende LNC wurden isoliert und für 48h bei 37°C

restimuliert.  $^3\text{H}$ -Thymidin ( $1\mu\text{Ci}$ ) wurde 16h vor Ablauf der Inkubationszeit zugesetzt. Die Proliferation wurde durch Bestimmung der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation gemessen. Signifikante Unterschiede zwischen Peptid-behandelten Mäusen und von *Alopecia totalis* betroffenen Kontrollmäusen sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

Die Trogozytoserate von Peptid-beladenen DC mit  $\text{CD4}^+$  oder  $\text{CD8}^+$  T-Zellen war deutlich niedriger in T-Zellen Peptid-behandelter Mäuse gegenüber Kontrollmäusen. Nach Restimulation mit Peptid-beladenen DC konnte die Trogozytoserate in allen Gruppen gesteigert werden, aber diese blieb in T-Zellen Peptid-behandelter Mäuse sehr gering (Abbildung 49).

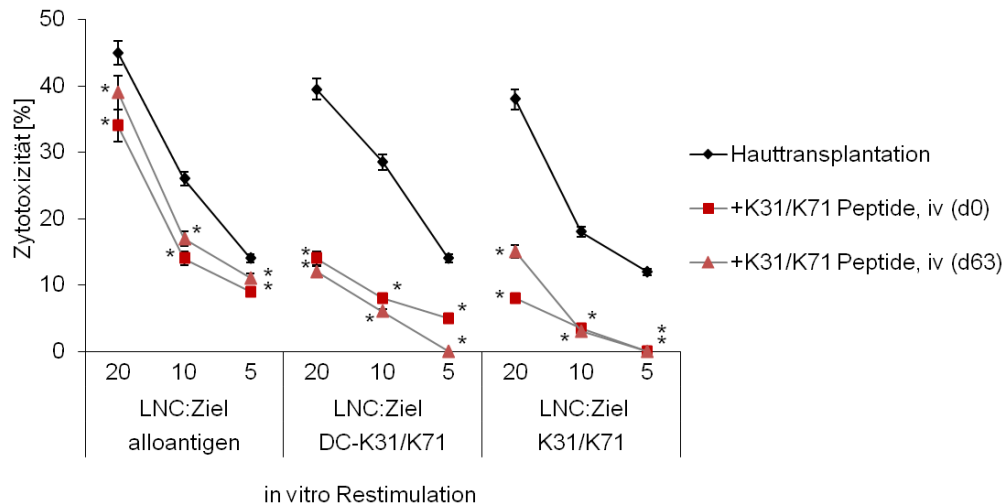




#### Abbildung 49: Trogozytose von Peptid-beladenen DC mit T-Zellen

In jungen C3H/HeJ-Mäusen wurde AA mittels Hauttransplantation induziert. Zur Therapie wurden 100µg K31-I/II und K71-I/II Peptide in physiologischer Kochsalzlösung wöchentlich intravenös injiziert. Untersucht wurden C3H/HeJ-Mäuse, die keine AA entwickelten (K31+K71 Peptide, iv (d0)) bzw. deren milde AA nicht weiter fortschritt (K31+K71, iv (d63)). (A) Dränierende LNC wurden isoliert und mit biotinylierten, beladenen DC für 2h bei 37°C kokultiviert und anschließend mit Streptavidin-APC und anti-CD4 bzw. anti-CD8 und Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper angefärbt. (B) dränierende LNC wurden isoliert und mit Peptid-beladenen DC restimuliert. Anschließend wurden die LNC mit biotinylierten, beladenen DC für 2h bei 37°C kokultiviert und mit Streptavidin-APC und anti-CD4 bzw. anti-CD8 und Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper angefärbt. (A, B) Signifikante Unterschiede zwischen Peptid-behandelten Mäusen und von *Alopecia totalis* betroffenen Kontrollmäusen sind durch \* gekennzeichnet.

Die Zytotoxizität der T-Zellen Peptid-behandelter Mäuse gegenüber K31- oder K71-Peptid-beladenen Zielzellen war um bis zu 75% reduziert gegenüber T-Zellen AA betroffener Kontrollmäuse. Die Zytotoxizität gegenüber Alloantigen-beladenen Zielzellen war nach Restimulation kaum beeinträchtigt (Abbildung 50).



### Abbildung 50: Zytotoxische T-Zellen

In jungen C3H/HeJ-Mäusen wurde AA mittels Hauttransplantation induziert. Zur Therapie wurden 100µg K31-I/II und K71-I/II Peptide in physiologischer Kochsalzlösung wöchentlich intravenös injiziert. Untersucht wurden C3H/HeJ-Mäuse, die keine AA entwickelten (K31+K71 Peptide, iv (d0)) bzw. deren milde AA nicht weiter fortschritt (K31+K71, iv (d63)). Dränierende LNC wurden *in vitro* mit DC restimuliert. Anschließend wurden die LNC im angegebenen Verhältnis mit <sup>3</sup>H-Thymidin-markierte Zielzellen (mit Peptid beladene T-Zell-Blasten) ausgesät und für 6h inkubiert. Die Radioaktivität wurde im β-Zähler detektiert und die % Zytotoxizität berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen Peptid-behandelten Mäusen und von *Alopecia totalis* betroffenen Kontrollmäusen sind durch \* gekennzeichnet. Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten sind gezeigt.

C3H/HeJ-Mäuse, denen mittels Hauttransplantation AA induziert wurde, konnten mit der Injektion tolerogener Peptide der Keratine K31 und K71 therapiert werden. In etwa 40-50% der behandelten Mäuse konnte die Induktion der AA bzw. die weitere Progression verhindert werden. Dies ging mit einem leichten Anstieg der T<sub>reg</sub> und deren Expression suppressiver Zytokine einher. Weiterhin konnte eine langanhaltende Anergieinduktion in K31- und K71-spezifischen, autoreaktiven T-Zellen demonstriert werden.

## 4 Diskussion

Alopecia Areata (AA) ist eine gegen Strukturen des anagenen Haarfollikels gerichtete T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung (Kalish und Gilhar 2003). AA führt zu Haarausfall am Kopf und kann sich zu den schweren Formen der *Alopecia totalis* und *Alopecia universalis* weiterentwickeln. AA ist ein gutes Modell zu Erforschung der komplexen Immunreaktionen bei Autoimmunerkrankungen, da AA keine lebensbedrohliche Erkrankung ist und auch im Spätstadium kein massives Organversagen, wie z.B. in Diabetes Typ I oder Multiple Sklerose, auftritt. Iatrogene Veränderungen des Immunsystems müssen ebenfalls nicht berücksichtigt werden, weil eine Therapie mit Immunsuppressiva nicht erforderlich ist (D'Ovidio 2014; Lu et al. 2006). Circa 20 % der C3H/HeJ-Mäuse entwickeln spontan AA, die der humanen Krankheit stark ähnelt (Sundberg et al. 1994). AA kann in naiven C3H/HeJ-Mäusen durch die Transplantation von Haut befallener Mäusen induziert werden (McElwee et al. 1998).

T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen sind durch die Expansion und Aktivierung autoreaktiver T-Zellen gekennzeichnet, die eine erhöhte Motilität und Apoptoseresistenz zeigen. Darüber hinaus sind häufig  $T_{reg}$  reduziert und im Falle der AA ist zudem das immunsuppressive Milieu der Haut (Immunprivileg) aufgehoben (Gilhar et al. 2005). Diese Komponenten - erhöhter Aktivierungszustand der autoreaktiven T-Zellen, Apoptoseresistenz und Schwächung immunregulatorischer/ immunsuppressiver Mechanismen- bilden bei der AA wie bei anderen Autoimmunerkrankungen auch den Ansatzpunkt für therapeutische Interferenz. Als optimale Therapie wird die Anergieinduktion und die Elimination autoreaktiver T-Zellen erachtet (Miller et al. 2007). Dies erfordert die Kenntnis des (der) krankheitsinduzierenden Antigens(e), die bisher für die AA nicht bekannt waren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Autoantigene der AA identifiziert und ihr therapeutisches Potenzial über die Induktion von Anergie nachgewiesen und welches später diskutiert wird.

Neben der Toleranzinduktion erfordert die Therapie von Autoimmunerkrankungen auch die Stärkung immunregulatorischer Mechanismen. Dies kann über den Transfer von  $T_{reg}$  und speziell bei der AA über die Expansion von MDSC mittels eines persistierenden Kontaktzems erfolgen (Singh et al. 2011). Als adjuvante Therapie kommt darüber hinaus eine Blockade aktivierter T-Zellen in Betracht. Hierzu werden häufig Antikörper eingesetzt, welche die akzessorischen Moleküle der T-Zellen blockieren. Frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass bei der AA insbesondere eine Kooperation von CD44 und CD49d die Effektorzellaktivität nachhaltig unterstützt und CD44v10 sowohl die Rekrutierung der Effektorzellen in den Bereich der Haarfollikel fördert als auch zusätzlich die Apoptoseresistenz der Effektorzellen steigert (Freyschmidt-Paul et al. 2000; Marhaba et al.



2006). In einem *in vitro* Modellsystem sollten die zu Grunde liegenden Mechanismen untersucht werden. Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse diskutiert und abschließend dargelegt, warum erwartet werden kann, dass eine persistierende Heilung von Autoimmunerkrankungen eine Kombinationstherapie aus Toleranzinduktion und Suppression erfordert.

## **4.1 Die Rolle von CD44 bei der persistierenden T-Zell-Aktivität in Autoimmunerkrankungen**

### **4.1.1 Wahl des EL4-Systems**

Die Immunreaktion der T-Zellen auf Pathogene erfolgt nach der Erkennung des pathogenen Antigens durch den T-Zell-Rezeptor und der Aktivierung akzessorischer Moleküle über kostimulatorische Signale der B7-Familie. Weiterhin ist das Mikromilieu für Ausrichtung sowie Stärke der Immunantwort entscheidend. Fehlen kostimulatorische Signale oder herrscht ein immunsuppressives Mikromilieu, werden T-Zellen in Anergie oder Apoptose getrieben. In Autoimmunerkrankungen ist nicht nur die Toleranz gegen Selbstantigene durchbrochen, vielmehr ist auch die Regulation der T-Zell-Aktivierung gestört. So kann eine T-Zell-Rezeptor-unabhängige Aktivierung durch akzessorische Moleküle erfolgen. In Multipler Sklerose (MS) wurde die Aktivierung durch  $\beta$ 2-Integrine (CD18), die für die T-Zell-Migration in das Gehirn und Rückenmark essentiell sind, mit der Progression und Schwere der MS korreliert (Sospedra und Martin 2005). Stimulation über  $\beta$ 2-Integrine führten zur Re-Organisation des Zytoskeletts und zur Signaltransduktion über Akt, Erk und JNK (Abram und Lowell 2009; Moser et al. 2009).

In Vorarbeiten des Labors wurde CD44, zuerst als *Homing*-Rezeptor für Lymphozyten und Hauptrezeptor für Hyaluronsäure beschrieben, als potentiell akzessorisches Molekül der AA postuliert. Um den molekularen Mechanismus der T-Zell-Rezeptor-unabhängigen Aktivierung über CD44 zu analysieren, wurde die murine Thymomzelllinie EL4 gewählt, da diese CD44s sowie CD18 stark, aber keinen T-Zell-Rezeptor exprimiert (Reiter 1979). CD44s besitzt keine Signaltransduktionsdomäne und ist daher auf die Kooperation mit signaltransduzierenden Adaptermolekülen angewiesen. Bei der AA konnte dies über die Assoziation von CD44s mit CD49d erfolgen. Weiterhin konnte eine verstärkte Extravasation von aktivierten CD44v10<sup>+</sup> AA-Effektorzellen in die Haut beobachtet werden und eine Blockade von CD44v10 verhinderte die Induktion einer AA. So waren im Hinblick auf die Rolle von CD44 bei der AA insbesondere zwei Fragen zu klären:

1. Welche Mechanismen liegen der präferentiellen Rekrutierung CD44v10 exprimierender Effektor-T-Zellen in die Haut zu Grunde und zeichnen sich CD44v10<sup>+</sup> T-Zellen durch gesteigerte Effektoraktivität aus?

## 2. Verstärkt die Assoziation von CD44 mit CD49d Effektorfunktionen der T-Zellen?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden EL4-Zellen mit CD44v10 (EL4-v10), Wildtyp CD49d (EL4-CD49d) oder mit mutiertem CD49d (EL4-mutCD49d) transfiziert. Die Punktmutation S988A inhibiert die Paxillin-Bindung an CD49d und die Signaltransduktion ist unterbrochen. Da keine der Transfektionen signifikante Änderungen im Expressionsprofil der Adhäsions- oder Aktivierungsproteine bewirkte, konnten die beobachteten Effekte den transfizierten Molekülen zugeschrieben werden.

### 4.1.2 Osteopontin vermittelt das präferentielle Einwandern von CD44v10<sup>+</sup> T-Zellen in die Haut und verstärkt deren Aktivität

Bei Autoimmunerkrankungen wurden in Lymphozyten veränderte Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle unter anderem von CD44 und varianten Isoformen CD44v beschrieben, so wurde eine Anreicherung von CD44v3 und CD44v10 für eine Reihe autoimmuner Hauterkrankungen beobachtet (Estess et al. 1998). In Biopsien von Patienten mit nicht-autoimmunen Hauterkrankungen wurden ebenfalls CD44v3<sup>+</sup> und CD44v10<sup>+</sup> Lymphozyten detektiert (Seiter et al. 1998). Die Expression von CD44v10 wurde ebenfalls auf hautinfiltrierenden Melanomzellen sowie kutan wachsenden Lymphommetastasen beobachtet (Yoshinari et al. 1999). CD44 ist für die Leukozytenextravasation essentiell (Nandi et al. 2004).

Eine gesteigerte Bindung von CD44v10 an Matrixproteine wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet, aber eine verstärkte Bindung des Chemokins OPN an CD44v10. EL4-v10-Zellen zeigten stärkere Adhäsion und Migration an OPN im Vergleich zu parentalen EL4-Zellen. Die CD44v10-OPN-Bindung konnte mit anti-CD44v10-Antikörper inhibiert werden. CD44 sowie varianten Isoformen CD44v3 und CD44v10 sind membranständige Proteoglykane mit Chondroitinsulfat- und Heparansulfat-Seitenketten, die Zytokine und Chemokine binden, z.B. bFGF, MIP1 $\beta$ , HGF und wie hier für CD44v10 gezeigt OPN (Hibino et al. 2005; Jackson et al. 1995; Kugelman et al. 1992). Die Seitenkettenmodifikation ist essentiell für die Bindung und Signaltransduktion, wie für die Extravasation von Endothelzellen während der Wundheilung beschrieben (Henke et al. 1996; Ihrcke und Platt 1996).

OPN, ein phosphoryliertes Glycoprotein, wird verstärkt von Endothelzellen unter inflammatorischen Bedingungen gebildet und unterstützt die Rekrutierung von aktivierten T-Zellen und Makrophagen (Bellahcène et al. 2008; Lund et al. 2013; Xie et al. 2001). Es wird von Intergrinen, CD44 sowie varianten CD44-Isoformen gebunden. Dem entsprach, dass mehr EL4-v10-Zellen als EL4-Zellen in die Haut migrierten und dass dieser Prozess unter inflammatorischen Bedingungen noch verstärkt wurde.

In C3H/HeJ-Mäusen konnte der Beginn der AA durch eine Antikörperblockade mit anti-CD44v10-Antikörper verzögert und die Schwere der AA abgeschwächt werden (Freyschmidt-Paul et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass die Extravasation der AA-Effektorzellen und die Rezirkulation von DC in die Haut durch eine Blockade mit anti-panCD44- oder anti-CD44v10-Antikörper gestört wird. Dies lässt sich nun durch die Inhibition der CD44v10-OPN-Interaktion erklären. Das *homing* der DC in den Lymphknoten wurde nur durch anti-panCD44-, nicht aber durch anti-CD44v10-Antikörper blockiert. Das lässt auf distinkte Rollen der einzelnen varianten Isoformen bei der Migration schließen (Freyschmidt-Paul et al. 2000; Weber et al. 1996). So wurde gezeigt, dass die Extravasation von Lymphozyten in den Darm in Morbus Crohn von deren CD44v7-Expression abhängig war (Wittig et al. 1998). Nach der intrazellulären OPN-CD44v10-Bindung ist eine Komplexbildung von CD44 mit Ezrin in der Migrationsfront der extravasierenden Zelle zu beobachten (Yoshinari et al. 1999; Zöller et al. 2007). Dementsprechend fördert eine lokale Entzündung der Haut, die zu einer verstärkten OPN-Expression auf Endothelzellen führt, die Rekrutierung von EL4-v10-Zellen im Vergleich zu den parentalen EL4-Zellen. Das beschriebene, erhöhte Migrations- und Extravasationsverhalten von CD44v10<sup>+</sup> Lymphozyten in AA resultiert daher wahrscheinlich aus der hier gezeigten Bindung von CD44v10 an OPN (Seiter et al. 1998; Zöller et al. 2002). Zudem induziert die OPN-Bindung durch CD44v10 die Expression von CXCL12 (SDF1a) und TNFR I auf Stromazellen und könnte dadurch zu einer gesteigerten Aktivierung der Lymphozyten beitragen (Erb et al. 2014). Die Interaktion von CXCL12 mit seinem Rezeptor CXCR4 auf Lymphozyten verstärkt deren Aktivierung nach Adhäsion und HA-Bindung durch CD44 (Avigdor et al. 2004). OPN-Bindung ist auch an der Aktivierung des MAP-Kinaseweges und der PI3K/Akt-Signaltransduktion beteiligt (Cantor und Shinohara 2009). Dies würde ebenfalls die in EL4-v10-Zellen beobachtete Steigerung der Proliferation, die mit erhöhter ERK und PKC Phosphorylierung einhergeht, und die Apoptoseresistenz durch PI3K und Akt Aktivierung, erklären. Die verstärkte Expansion und Apoptoseresistenz der hautinfiltrierenden Lymphozyten im AA-Mausmodell ließe sich zum Teil ebenfalls durch die gesteigerte Bindung von CD44v10 an OPN erklären.

#### **4.1.3 Die Assoziation von CD44 an CD49d fördert persistierende T-Zell-Aktivität**

CD44, der Hauptrezeptor für HA, ist *in vivo* an dem Prozess des Rollens von T-Zellen entlang der Endothelzellen und der starken Adhäsion der T-Zellen an aktivierte Endothelzellen beteiligt. Es wurde gezeigt, dass dieser Prozess mit einer Assoziation von CD44 mit CD49d einhergeht und der Komplex in die Migrationsfront der T-Zelle transloziert (Nandi et al. 2004). Die Translokation fördert die Motilität der T-Zellen und erleichtert die Extravasation in den Entzündungsbereich. Für die Extravasation ist die zytoplasmatische Domäne und die Interak-

tion mit F-Aktin über ERM-Moleküle (Ezrin, Radaxin, Moesin) erforderlich (Nandi et al. 2004; Tsukita et al. 1994). AA-Effektorzellen zeigen ebenfalls eine erhöhte Migrationsfähigkeit, die möglicherweise auf die Assoziation von CD44 mit CD49d und die Lokalisation des Komplexes in den GEM zurückzuführen ist (Marhaba et al. 2006). Diese Annahme konnte im EL4-Modellsystem belegt werden. EL4-CD49d-Zellen zeigen eine gesteigerte Motilität, die sowohl mit anti-panCD44- als auch mit anti-CD49d-Antikörpern inhibiert werden konnte. Jedoch konnte keine verstärkte Migration in EL4-mutCD49d-Zellen festgestellt werden. Durch die mutierte zytoplasmatische Domäne von CD49d erfolgte keine Verankerung in den GEM. Die Translokation beider Moleküle in die GEM ist für deren Assoziation essentiell und erfolgt nur in den EL4-CD49d-Zellen (Nandi et al. 2004).

In den Lymphozyten von AA-betroffenen C3H/HeJ-Mäusen wurde zudem ein erhöhter Aktivierungszustand nachgewiesen. Da CD44 in T-Zellen konstitutiv mit Ick assoziiert ist, ermöglichte die CD44-CD49d-Komplexbildung die FAK-Phosphorylierung durch Ick (Ilangumaran et al. 1998; Marhaba et al. 2006). Die Aktivierung von FAK in den AA-Effektorzellen erhöhte die Apoptoseresistenz über den PI3- und MAP-Kinaseweg, der zu einer höheren Expression der anti-apoptischen Moleküle Bcl2 und BclXL und zu einer geringeren Expression proapoptischer führte (Marhaba et al. 2006). In EL4-CD49d-Zellen förderte die Assoziation von CD44 mit CD49d in GEM die Aktivität von Ezrin sowie die Phosphorylierung von ERK und steigerte die Apoptoseresistenz der EL4-CD49d-Zellen. Allerdings ist der Einfluss der CD44-CD49d-Assoziation in EL4-CD49d-Zellen auf die Proliferation und Apoptoseresistenz geringer als in aktivierten Leukozyten *in vivo*, da in EL4-CD49d-Zellen nur die Aktivierung des Akt-Signalweges erfolgt, in nicht transformierten Leukozyten zusätzlich auch die des JNK-Signalweges (Marhaba et al. 2006).

In EL4-CD49d-Zellen wurde eine starke, in EL4-mutCD49d-Zellen hingegen nur eine sehr schwache Ko-Immünopäzipitation der T-Zell-assoziierten Signaltransduktionsmoleküle Ick, MEK1 und p38 mit CD49d nach FN-Stimulation gefunden. Dieser Befund bestätigt, dass CD49d Zugang zu CD44-Adaptermolekülen im Komplex mit CD44 erhält. Untersuchungen in AA-Effektorzellen zeigten, dass über akzessorische Moleküle eine vollständige Aktivierung der T-Zellen bei suboptimaler Aktivierung des CD3-Komplexes erzielt werden kann (Marhaba et al. 2006).

Neben der CD44v10 vermittelten OPN-Bindung trägt die Assoziation von CD44 mit CD49d auf aktivierten Lymphozyten der AA zur gesteigerten Motilität, persistierenden Aktivierung sowie erhöhter Apoptoseresistenz bei. Eine Blockade von CD44v10 oder von CD44 und

---

CD49d über einen bispezifischen Antikörper sollte daher als supportive Therapie bei der AA in Betracht gezogen werden.

## **4.2 Identifikation Haar-spezifischer Keratine als Autoantigene der AA – therapeutische Implikationen**

### **4.2.1 Wahl der Haar- und Nagel-spezifischen Keratine als potenzielle Antigene**

Jeder einzelne Haarfollikel unterliegt einem zyklischen Prozess, der in drei Phasen eingeteilt wird. Die Anagenphase ist die Phase des Haarwachstums sowie der Pigmentierung, während die folgende Katagenphase durch einen Wachstumsstopp und strukturelle Änderungen gekennzeichnet ist. Die letzte Phase ist die Telogenphase, eine Ruhephase bevor ein neuer Zyklus beginnt und ein neues Haar gebildet wird (Schneider et al. 2009).

Die Zielstrukturen der autoreaktiven T-Zellen in der AA sind die Haarfollikel, die sich in der anagenen Phase und Melanogenese befinden (Kalish und Gilhar 2003; Kos und Conlon 2009). Daher werden vornehmlich zwei Gruppen von potenziellen Autoantigenen diskutiert, nämlich Melanozyten- oder Haarkeratin-assoziierte Proteine. Für eine Beteiligung der Melanozyten am Krankheitsverlauf sprechen die Beobachtungen, dass weiße Haare weniger betroffen sind als pigmentierte und dass zuerst depigmentierte Haare nachwachsen (Paus et al. 1993). Auch wurden Melanozyten-erkennende Antikörper und T-Zellen in Patientenserum nachgewiesen (Kemp et al. 2011). In sehr seltenen Fällen der AA tritt zudem Vitiligo, eine Autoimmunerkrankung die zur Depigmentierung der Haut führt, auf (Tobin 2014).

In dieser Arbeit wurden Haar- und Nagel-spezifischen Keratine untersucht, da eine Involvierung Haar- und Nagel-spezifischer Keratine die strikte Begrenzung der AA auf den Haarfollikel erklären könnte. Keratine werden ebenfalls nur während der anagenen Phase gebildet (Moll et al. 2008). Zudem treten in schweren Formen der AA auch vermehrt Nagelmissbildungen auf. Antikörper gegen K16 und Trychohyalin, ein haarspezifisches Strukturprotein, wurden ebenfalls in Patientenserum nachgewiesen (Leung et al. 2010). Es wurde allerdings bisher weder für Melanozyten- noch für Keratin-spezifische Antigene überprüft, ob sie als induzierendes Agens in Frage kommen.

### **4.2.2 DC-Vakzinierung mit Haar- und-Nagel-spezifischen Keratinen führt zur Induktion von Alopecia Areata**

In naiven Lymphozyten lösten zwei der getesteten Keratine, nämlich K31 und K71, wenn sie von DC präsentiert wurden, eine schwache, aber signifikante Immunreaktion aus. K31 wird

während der Anagenphase im Cortex exprimiert und K71 wird in der Balbregion, in der Huxley- sowie in der Henley-Schicht der inneren Haarwurzelscheide exprimiert (Moll et al. 2008). Darüber hinaus konnten K31- und K71-spezifische T-Zellen in SkIL und dränierenden LNC von AA-betroffenen C3H/HeJ-Mäusen nachgewiesen werden. Schließlich konnte in naiven C3H/HeJ-Mäusen eine milde Form der AA durch Vakzinierung mit K31- und K71-Peptiden beladenen DC induziert werden. Die DC-Vakzinierung erfolgte ohne weitere Adjuvantien oder inflammatorische Stimuli. Die Progression der über Keratin-Peptide induzierten AA entspricht dem natürlichen Verlauf der Krankheit (McElwee und Hoffmann 2002; McElwee et al. 2003). Sie beginnt nicht an der Einstichstelle oder dem nächstgelegenen Lymphknoten, sondern führt zu grauen, kurzen Haaren im gesamten unteren Rückenbereich, zu Haarausfall an der Schnauze und am Bauch. Immunhistologische Untersuchungen der Haut zeigten die beschriebene Infiltration von T-Zellen, Makrophagen um betroffene Haarfollikel (Perret et al. 1984). *Ex vivo* Analysen zeigten einen signifikanten Anstieg Keratin-spezifischer T-Zellen auf 10-15% wie er auch bei einer florierenden AA beobachtet wird.

Die stärkste Immunreaktion trat bei gleichzeitiger Präsentation von MHC I und II bindenden K31- oder K71-Peptiden auf. Ein vergleichbarer, wenn auch verzögerter Haarverlust wurde bei der DC-Vakzinierung mit nur MHC I bindenden K31-Peptiden beobachtet, hingegen war die Effizienz einer DC-Vakzinierung mit MHC I bindenden K71-Peptiden im Vergleich zur Präsentation von MHC I und II bindenden K71-Peptiden deutlich schwächer. Die geringere Wirkung ist wahrscheinlich auf die fehlende Aktivierung von  $T_H$ -Zellen, die nur auf MHC II präsentierte Peptide erkennen, zurückzuführen. Der verzögerte Beginn des Haarausfalls könnte durch Keratine, die nach der ersten Attacke auf Haarfollikel durch eine geringe Anzahl aktivierter CTL freigesetzt und prozessiert wurden, ausgelöst worden sein.

Die essentielle Beteiligung von  $T_H$ -Zellen an der Progression zu einer *Alopecia totalis* wurde schon bei T-Zell-Transferstudien gezeigt (McElwee et al. 2005). Hierbei konnte eine *Alopecia totalis* nur nach mehrmaligem Transfer von  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen beobachtet werden, hingegen zeigte sich nach wiederholtem Transfer von  $CD8^+$  CTL nur ein lokaler Haarausfall (McElwee et al. 2005). Dem entspricht, dass ein einmaliger Transfer von T-Zellen DC-vakzinierter C3H/HeJ-Mäuse in naiven Empfängern nur einen lokalen Haarausfall verursachte.

Durch die DC-Vakzinierung konnte neben der Aktivierung Keratin-spezifischer, autoreaktiver T-Zellen auch das immunsuppressive Milieu in der Haut (Immunprivileg der Haut und das Haarfollikels) durchbrochen werden (Christoph et al. 2000). So wurde eine gesteigerte CD95L-Expression und erhöhte Sekretion von  $IFN\gamma$  und IL6 in SkIL sowie den dränierenden Lymphknoten nachgewiesen. Der Anteil von  $T_{reg}$  war in SkIL und dränierenden Lymphknoten

reduziert. Dies deutet darauf hin, dass ruhende autoreaktive T-Zellen in der Haut vorhanden sind, die durch die DC das nötige Aktivierungssignal erhalten und expandieren.

Da K31 und K71-Peptide nicht zur Induktion einer *Alopecia totalis* oder *Alopecia universalis* ausreichen, sind wahrscheinlich noch weitere Autoantigene an der Entwicklung der *Alopecia totalis* beteiligt. Daher erscheint es fraglich ob, K31- und K71-Peptide ausreichen, um bei natürlicher AA Toleranz zu induzieren. Toleranzinduktion ist jedoch ein wesentliches Kriterium, neben Induktion einer Autoimmunerkrankung durch geeignete Immunisierung, für den Nachweis eines Autoantigens als Auslöser der Autoimmunerkrankung. Somit sollte dieser *proof of principle* durchgeführt werden, um auch Hinweise auf eine potentielle therapeutische Effizienz zu erhalten.

#### **4.2.3 K31- und K71-Peptid-induzierte Toleranz und therapeutische Effizienz in AA-betroffenen C3H/HeJ-Mäusen**

Induktion von Toleranz in autoreaktiven T-Zellen ist die einzig mögliche Therapie bei Autoimmunerkrankungen, bei der ein langanhaltender kurativer Effekt ohne das Auftreten von Nebenwirkungen erwartet werden kann (Miller et al. 2007). Auf Grund der fehlenden Kenntnis der relevanten Autoantigene ist dies bisher nur bei wenigen Autoimmunerkrankungen möglich. Bei Diabetes Typ I, Rheumatoider Arthritis und MS werden Autoantigene jedoch bereits therapeutisch genutzt bzw. sind im Rahmen klinischer Studien in Erprobung (Sabatos-Peyton et al. 2010). Hierbei werden Autoantigene in tolerogener Form, in der Regel adjuvantfrei in wässriger Lösung, verabreicht. Die Verabreichung sehr hoher oder sehr niedriger Dosen fördert die Induktion von Anergie in T-Zellen oder unterstützen die Expansion von  $T_{reg}$  (Miller et al. 2007; Saraiva et al. 2009). Zur therapeutischen Intervention wurden hohe Dosen K31- und K71-Peptide in Saline gelöst intravenös injiziert. Um den Effekt auf eine sich entwickelnde oder bereits persistierende AA zu untersuchen, wurden C3H/HeJ-Mäuse entweder direkt nach der Hauttransplantation bzw. nach Entwicklung einer milden AA behandelt. Die Desensibilisierung verzögerte bzw. verhinderte die AA-Progression in beiden Gruppen. *Ex vivo* Analysen der SkIL und dränierenden LNC zeigten, dass eine langanhaltende Anergie induziert wurde. Die T-Zellen konnten *in vitro* nicht durch eine Restimulation mit Peptid-beladenen DC aktiviert werden, wobei die Reaktivität auf allogene Antigene bzw. Mitogene nicht beeinträchtigt war. Als Auslöser der Toleranz werden migrierenden, unreife, sogenannte *steady-state*-DC diskutiert, die die freien Peptide aufnehmen und präsentieren. *Steady-state*-DC exprimieren aber keine kostimulatorischen Moleküle, so dass das zweite nötige, kostimulatorische Signal zur Aktivierung der T-Zellen unterbleibt und Anergie in den

T-Zellen induziert wird (Lutz und Schuler 2002). Weiterhin können aktivierte T-Zellen über FAS-FAS-Ligand-Interaktionen in Apoptose getrieben werden (*Activation induced cell death*) (Lutz und Kurts 2009). In der Tat wurde nicht nur eine Ruhigstellung sondern auch eine Reduktion Keratin-spezifischer T-Zellen in den behandelten C3H/HeJ-Mäusen beobachtet.

Die *ex vivo* Analyse der Lymphozyten behandelten Tiere verwies zudem auf einen höheren Anteil an CTLA4<sup>+</sup> T-Zellen und T<sub>reg</sub> in den dränierenden Lymphknoten. Die gesteigerte Expression und Sekretion von TGFβ und IL10 könnte durch eine negative *feedback*-Regulation durch ein Überangebot freier Peptide verursacht worden sein (Arens 2012). IL10 reguliert die Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen herunter und fördert die Expansion von T<sub>reg</sub> (Saraiva et al. 2009). TGFβ inhibiert die Proliferation aktivierter Effektorzellen, fördert die Differenzierung von T<sub>reg</sub> und die T<sub>H</sub>-Differenzierung zu T<sub>H</sub>2, die nicht mit zytotoxischen T-Zellen kooperieren. Hingegen wurde keine Expansion von MDSC beobachtet (Zhou et al. 2011).

Verzögerung und Abschwächung der AA-Progression war effektiver je früher mit der Therapie begonnen wurde. Dies wurde auch für Diabetes Typ I gezeigt, bei der in späteren Stadium eine Ausweitung des Antigenpools beobachtet wurde, so dass nicht mehr alle autoreaktiven T-Zellen mit den zur Therapie eingesetzten Peptide eliminiert wurden (Vanderlugt und Miller 2002). Eine Desensibilisierung inhibiert zudem nur die Aktivierung von naiven T-Zellen, nicht aber Gedächtnis-T-Zellen, die bei einer bereits persistierenden Autoimmunerkrankung vorhanden sind.

Trotz der langfristigen Toleranzinduktion und Stabilität der AA, war die Therapie nicht kurativ. Es gibt dafür zwei sich nicht ausschließende Erklärungen. Zum einen die wahrscheinliche Beteiligung weiterer Autoantigene in der AA und zum anderen bereits vorhandene Gedächtnis-T-Zellen, die nicht auf eine Antigen-spezifische Toleranzinduktion reagieren. Wie bereits erwähnt, werden Melanozyten- und Melanogenese-assoziierte Antigene ebenfalls als Autoantigene der AA diskutiert. Diese sind aber mit der ausschließlichen Beschränkung auf Haarfollikel schwer vereinbar, könnten aber sehr wohl nach einer ersten Destruktion des Haarfollikels freigesetzt werden und zur Aktivierung einer zusätzlichen T<sub>H</sub>-Immunantwort beitragen, die möglicherweise für eine Progression zu *Alopecia totalis* nötig ist. Dies entspricht dem bereits erwähnten Erfahrungen des erweiterten Autoantigenpools bei fortschreitendem Diabetes Typ I (Vanderlugt und Miller 2002). Eine homospezifische Unterstützung, d.h. T<sub>H</sub>-Zellen und CTL erkennen dasselbe Antigen, ist hingegen nicht erforderlich, so können auch heterospezifische Aktivierungen eine bestehende Immunantwort verstärken (de Goer de Herve, Marie-Ghislaine et al. 2008). Für eine zusätzliche Aktivierung von B-Zellen, die über eine T<sub>H</sub>2-



Immunreaktion vermittelt wird, spricht, dass hauptsächlich gegen Melanozyten-assoziierte Antigene gerichtete Antikörper in Patientenseren nachgewiesen wurden (Kemp et al. 2011). Eine Zerstörung des Haarfollikels durch Zellen des angeborenen Immunsystems wurde ebenfalls beschrieben (Petukhova et al. 2010). So enthalten Haarfollikel infiltrierende Zellen natürliche Killerzellen (NK) und NKT-Zellen (Ito et al. 2008). Diese können von  $T_H1$ -sekretierten Zytokinen, besonders IL2, aktiviert werden und in späteren Stadien die Progression einer AA unterstützen.

Zusammengenommen sind Keratin-spezifische Autoantigene als primäre Autoantigene der AA sehr wahrscheinlich und K31 sowie K71 konnten als solche identifiziert werden. An der Progression zu *Alopecia totalis* sind wahrscheinlich weitere Autoantigen, die sowohl Keratin- als auch Melanozyten-spezifisch sein können, beteiligt. Diese könnten erst im Verlauf der Erkrankung aus bereits zerstörten Zellen freigesetzt werden. Ungeachtet dieser Einschränkungen erscheint eine Keratin-spezifische Toleranzinduktion speziell bei progressiver oder therapieresistenter AA als vielversprechende Therapiealternative.

### 4.3 Ausblick

AA ist die einzige physisch nicht beeinträchtigende Autoimmunerkrankung und erfordert mit nur sehr wenigen Ausnahmen keine immunsuppressive Therapie. Weiterhin entspricht das Tiermodell der AA weitgehend der AA beim Menschen. Somit bietet sich AA als Modell zur Analyse der komplexen Reaktionen des Immunsystems während der Pathogenese und Therapie einer Autoimmunerkrankung an. Außerdem ergibt sich die Möglichkeit neue therapeutische Behandlungen und deren Mechanismen zu untersuchen und bekannte Therapieansätze zu verbessern. Dies ist dringend erforderlich, da viele Autoimmunerkrankungen die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen und letztlich tödlich verlaufen. Hinzu kommt, dass die Frequenz an Autoimmunerkrankungen kontinuierlich ansteigt (Deutsche Gesellschaft für Autoimmunerkrankungen).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmalig Autoantigene der AA identifiziert und über Toleranzinduktion ein langfristiger Stillstand der AA erzielt werden. Gleichzeitig ergeben sich aus den erhobenen Befunden Möglichkeiten einer verbesserten Therapie, die experimentell zu überprüfen sind.

Die Haar-spezifischen Keratine K31 und K71 induzieren keine *Alopecia totalis* und eine Heilung der AA konnte nicht erreicht werden, so dass von einer Beteiligung weiterer Autoantigene ausgegangen werden muss. Daher sollten weitere Keratine sowie Melanogenese-assoziierte Antigene auf ihre Immunogenität getestet werden. Durch die mögliche Erweiterung des Autoantigenpools im Verlauf der Erkrankung, sollten diese Untersuchungen bereits florierende AA

---

mit einbeziehen. Generell müssen die im murinen System erhobenen Befunde bei Patienten mit AA überprüft werden.

Toleranzinduktion ist gegenüber Gedächtnis-T-Zellen ineffizient, so dass supportive Therapien erforderlich sind. Zum einen können Gedächtnis-T-Zellen direkt über eine Blockade akzessorischer Moleküle supprimiert werden, zum anderen können immunsuppressive Faktoren bzw. Zellen stimuliert werden. In Hinblick auf die erste Möglichkeit könnten Antikörperblockaden gegen CD44s und variante Isoformen CD44v, insbesondere CD44v10 bei Autoimmunerkrankungen der Haut, aber auch gegen Integrine, wie CD49d in der AA, eingesetzt werden. Eine effizientere Therapie ergäbe sich möglicherweise durch die Verwendung bispezifischer Antikörper gegen zwei akzessorische Moleküle, z.B. anti-CD44-anti-CD49d-Antikörper in AA.

Auf dem Prinzip der Aktivierung suppressiver Mechanismen beruht die derzeitig effektivste Therapie der AA, die Induktion eines milden Kontaktekzems (Ajith et al. 2006). Ein Kontaktekzem führt hauptsächlich zur Expansion und Aktivierung von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) (Singh et al. 2011). MDSC inhibieren die T-Zell-Aktivierung, Proliferation und induzieren Apoptose durch Hochregulation proapoptotischer Proteine in den Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen, die gegen Toleranzinduktion unempfindlich sind (Singh et al. 2011). Da MDSC naive autoreaktive T-Zellen nicht angreifen, kommt es nach der Behandlung häufig zu Rezidiven. Daher bietet es sich an, die Effektivität einer Kombination beider Therapien- Toleranzinduktion und Suppression- zu evaluieren. Da MDSC *in vitro* leicht aus humanen Lymphozyten im Blut generierbar sind, könnte die belastende Behandlung der langfristigen Aufrechterhaltung eines Kontaktekzems durch den direkten Transfer von MDSC ersetzt werden (Highfill et al. 2010; Obermajer und Kalinski 2012). Eine Kombination aus Autoantigen-spezifischer Therapie und MDSC verspricht einen langfristigen Erfolg, da sowohl Toleranz in naiven T-Zellen induziert wird als auch aktive Effektorzellen durch die MDSC inhibiert werden. Die Übertragung dieser Form der Therapie auf weitere Autoimmunerkrankungen mit gravierendem Verlauf wäre ebenfalls denkbar.

## 5 Zusammenfassung

*Alopecia Areata* (AA) ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung der Haut, die die Strukturen des anagenen Haarfollikels zerstört und zu kreisrundem Haarausfall führt. In schweren Formen kommt es zum Ausfall des gesamten Haupthaars (*Alopecia totalis*) oder zum Verlust sämtlicher Körperbehaarung (*Alopecia universalis*).

Die derzeitig wirksamste Therapie ist die Induktion eines milden Kontaktekzems, das über die Expansion myeloider Suppressorzellen (MDSC) Proliferation aktivierter AA-Effektorzellen inhibiert und Apoptose induziert. Nach Beendigung der Therapie kommt es jedoch häufig zu Rezidiven. Alternativ können Effektorzellen über eine Blockade akzessorischer Moleküle ruhiggestellt werden. So wurde bei der AA gezeigt, dass Antikörper gegen CD44s, das in aktivierten Lymphknotenzellen der AA mit CD49d assoziiert, oder Antikörper gegen die variante Isoform CD44v10, die auf hautinfiltrierenden T-Zellen hochexprimiert ist, AA-Progression verzögern. Die zu Grunde liegenden Mechanismen waren noch nicht geklärt und sollten in dieser Arbeit näher untersucht werden. Vornehmliches Ziel der Arbeit war die Identifizierung von Autoantigenen der AA, da die effektivste Therapie bei Autoimmunerkrankungen eine Autoantigen-spezifische Toleranzinduktion darstellt.

Begonnen wurde mit der Klärung des therapeutischen Wirkprinzips einer Blockade von CD44. Die Untersuchungen wurden mit der Thymom-Zelllinie EL4, die konstitutiv CD44s exprimiert, durchgeführt. Zur Klärung der Relevanz von CD44v10 wurden EL4-Zellen mit CD44v10-cDNA transfiziert (EL4-v10). CD44v10 bindet an OPN, ein Chemokin, das in inflammatorischen Prozessen vermehrt auf Endothelzellen der Blutgefäße und der Haut exprimiert wird. EL4v10-Zellen adhären verstärkt an OPN und zeigen eine gesteigerte Migrationsfähigkeit. Darüber hinaus unterstützt OPN in EL4-v10-Zellen Apoptoseresistenz. Die Extravasation CD44v10<sup>+</sup> hautinfiltrierender LNC ist daher wahrscheinlich auf die Bindung an OPN zurückzuführen, die zusätzlich das Überlebenspotenzial der Effektorzellen verstärkt, so dass eine Antikörper-Blockade von CD44v10 bei Entzündungen und Autoimmunerkrankungen der Haut sinnvoll erscheint.

Vorarbeiten hatten gezeigt, dass in aktivierten T-Zellen der AA CD44 mit CD49d assoziiert und kooperiert. Dies geht mit einer signifikanten Steigerung der Migration, Proliferation und Apoptoseresistenz einher. Um nachzuweisen, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf die Assoziation von CD44 mit CD49d zurückzuführen sind, wurden CD44s<sup>+</sup> EL4-Zellen mit Wildtyp CD49d-cDNA (EL4-CD49d) oder mit mutierter CD49d-cDNA transfiziert (EL4-mutCD49d), wobei die Punktmutation S988A die Assoziation von CD49d mit FAK und

Paxillin verhindert. Wie für AA-Effektorzellen beschrieben, verstärkt die Komplexbildung von CD44 und CD49d Proliferation und Apoptoseresistenz der EL4-CD49d im Vergleich zu parentalen EL4-Zellen und anti-panCD44- oder anti-CD49d-Antikörper wirken gleichermaßen inhibierend. EL4-mutCD49d-Zellen zeigen keine gesteigerte Proliferation oder Apoptoseresistenz. Die Translokation des CD44s-CD49d-Komplexes in glykolipidreiche Mikrodomänen, die ein Ankerpunkt für Signal-transduzierende Moleküle sind, erfolgt nur in EL4-CD49d-Zellen. Dem entspricht eine reduzierte Aktivierung von T-Zell-assoziierten Signaltransduktionskaskaden in EL4-mutCD49d-Zellen. Eine Antikörper-Blockade von CD44s und CD49d bietet daher eine weitere Möglichkeit einer supportiven Therapie bei der AA.

Die Induktion von Toleranz ist die Methode der Wahl bei Autoimmunerkrankungen. Um die Voraussetzungen hierfür zu schaffen, habe ich potentielle Autoantigene der AA in Haar- und Nagel-spezifischen Keratinen, die im anagenen Haarfollikel exprimiert werden, ausgewählt und auf ihr immunogenes Potenzial untersucht. Dazu wurden mittels eines Antigen-Vorhersageprogramms Peptide ausgewählt, die an den Haupthistokompatibilitätskomplex I oder II binden. Peptide der Keratine K31 und K71 aktivieren bei der Präsentation durch dendritische Zellen (DC) Proliferation und IFN $\gamma$ -Sekretion naiver Lymphozyten *in vitro* und induzieren in C3H/HeJ-Mäusen bei wöchentlicher subkutaner Applikation Peptid-beladener DC eine milde AA mit Haarausfall an Schnauze und Flanken sowie kurzem, grauem Haar am Rücken. Nach einer DC-Vakzinierung mit nur MHC I bindenden Peptiden der Keratine K31 und K71 entwickelte sich eine mildere AA mit Verzögerung. *Ex vivo* Analysen zeigten einen signifikanten Anstieg Keratin-spezifischer T-Zellen auf 10-15%, wie in einer florierenden AA.

Die Applikation von Autoantigenen in tolerogener Form führt zur selektiven Anergie (Ruhigstellung) oder zur Elimination autoreaktiver T-Zellen und ist daher die bevorzugte Therapie von Autoimmunerkrankungen, soweit die Autoantigene bekannt sind. Daher wurden K31- und K71-Peptide ohne Adjuvant intravenös in C3H/HeJ-Mäuse entweder vor dem Beginn der AA oder nach Entwicklung einer milden AA injiziert. Die Behandlung war nicht kurativ, verzögerte die Entwicklung einer AA aber signifikant und verhinderte weitgehend die Progression. *Ex vivo* Kontrollen belegten eine langanhaltende Anergie Keratin-spezifischer T-Zellen, wobei die Reaktivität gegen unabhängige Stimuli nicht eingeschränkt war. Darüber hinaus unterstützte die Applikation der Keratinpeptide in tolerogener Form die Expansion regulatorischer T-Zellen und die Sekretion der immunsuppressiven Zytokine IL10 und TGF $\beta$ .

Diese Untersuchungen belegen, dass K31 und K71 Autoantigene der AA sind und weisen, da keine Alopecia totalis ausgelöst wurde, auf die Beteiligung weiterer Autoantigene hin.

In Kürze: Das Wirkprinzip von CD44v10 und eines CD44-CD49d-Komplexes in AA konnte geklärt werden. Es wurde nachgewiesen, dass eine entsprechende Antikörperblockade als supportive Therapie bei der AA sinnvoll erscheint. Erstmals wurden Autoantigene der AA identifiziert und deren therapeutische Effizienz über eine Autoantigen-spezifische Toleranzinduktion belegt. Da über Toleranzinduktion ausschließlich nicht aktivierte T-Zellen ruhiggestellt oder eliminiert werden, sollte eine persistierende Heilung der AA über eine kombinierte Therapie aus Toleranzinduktion und Suppression aktivierter T-Zellen möglich sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abram, C. L.; Lowell, C. A. (2009): The ins and outs of leukocyte integrin signaling. In: *Annu. Rev. Immunol.* 27, S. 339–362. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132554.
- Acuto, O.; Michel, F. (2003): CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. In: *Nat Rev Immunol* 3 (12), S. 939–951. DOI: 10.1038/nri1248.
- Ahrens, S.; Zelenay, S.; Sancho, D.; Hanc, P.; Kjaer, S.; Feest, C. et al. (2012): F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. In: *Immunity* 36 (4), S. 635–645. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.008.
- Ajith, C.; Gupta, Somesh; Kanwar, Amrinder Jit (2006): Efficacy and safety of the topical sensitizer squaric acid dibutyl ester in Alopecia areata and factors influencing the outcome. In: *J Drugs Dermatol* 5 (3), S. 262–266.
- Alkhalifah, Abdullah (2011): Topical and intralesional therapies for alopecia areata. In: *Dermatol Ther* 24 (3), S. 355–363. DOI: 10.1111/j.1529-8019.2011.01419.x.
- An dl, Thomas; Reddy, Seshamma T.; Gaddapara, Trivikram; Millar, Sarah E. (2002): WNT Signals Are Required for the Initiation of Hair Follicle Development. In: *Developmental Cell* 2 (5), S. 643–653. DOI: 10.1016/S1534-5807(02)00167-3.
- Ando, Hideya; Niki, Yoko; Ito, Masaaki; Akiyama, Kaoru; Matsui, Mary S.; Yarosh, Daniel B.; Ichihashi, Masamitsu (2012): Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. In: *J. Invest. Dermatol.* 132 (4), S. 1222–1229. DOI: 10.1038/jid.2011.413.
- Ando, Hideya; Niki, Yoko; Yoshida, Masaki; Ito, Masaaki; Akiyama, Kaoru; Kim, Jin-Hwa et al. (2011): Involvement of pigment globules containing multiple melanosomes in the transfer of melanosomes from melanocytes to keratinocytes. In: *Cell Logist* 1 (1), S. 12–20. DOI: 10.4161/cl.1.1.13638.
- Arens, Ramon (2012): Rational design of vaccines: learning from immune evasion mechanisms of persistent viruses and tumors. In: *Adv. Immunol.* 114, S. 217–243. DOI: 10.1016/B978-0-12-396548-6.00009-3.
- Atit, Radhika; Sgaier, Sema K.; Mohamed, Othman A.; Taketo, Makoto M.; Dufort, Daniel; Joyner, Alexandra L. et al. (2006): Beta-catenin activation is necessary and sufficient

- to specify the dorsal dermal fate in the mouse. In: *Dev. Biol.* 296 (1), S. 164–176. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.04.449.
- Avigdor, A.; Goichberg, P.; Shivtiel, S.; Dar, A.; Peled, A.; Samira, S. et al. (2004): CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. In: *Blood* 103 (8), S. 2981–2989. DOI: 10.1182/blood-2003-10-3611.
- Barahmani, Nazila; Andrade, Mariza de; Slusser, Joshua P.; Wei, Qingyi; Hordinsky, Maria; Price, Vera H. et al. (2008): Human leukocyte antigen class II alleles are associated with risk of alopecia areata. In: *J Invest Dermatol* 128 (1), S. 240–243. DOI: 10.1038/sj.jid.5700973.
- Bellahcène, A.; Castronovo, V.; Ogbureke, K. U. E.; Fisher, L. W.; Fedarko, N. S. (2008): Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. In: *Nat. Rev. Cancer* 8 (3), S. 212–226. DOI: 10.1038/nrc2345.
- Belz, G. T.; Nutt, S. L. (2012): Transcriptional programming of the dendritic cell network. In: *Nat. Rev. Immunol.* 12 (2), S. 101–113. DOI: 10.1038/nri3149.
- Botchkarev, V. A.; Botchkareva, N. V.; Roth, W.; Nakamura, M.; Chen, L. H.; Herzog, W. et al. (1999): Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. In: *Nat Cell Biol* 1 (3), S. 158–164. DOI: 10.1038/11078.
- Botchkarev, Vladimir A.; Botchkareva, Natalia V.; Sharov, Andrei A.; Funa, Keiko; Huber, Otmar; Gilchrist, Barbara A. (2002): Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nontylotrich) hair follicles. In: *J. Invest. Dermatol.* 118 (1), S. 3–10. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01645.x.
- Burgdorf, S.; Kautz, A.; Bohnert, V.; Knolle, P. A.; Kurts, C. (2007): Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. In: *Science* 316 (5824), S. 612–616. DOI: 10.1126/science.1137971.
- Cantor, H.; Shinohara, M. L. (2009): Regulation of T-helper-cell lineage development by osteopontin: the inside story. In: *Nat Rev Immunol* 9 (2), S. 137–141. DOI: 10.1038/nri2460.
- Caulin, C.; Ware, C. F.; Magin, T. M.; Oshima, R. G. (2000): Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. In: *J Cell Biol* 149 (1), S. 17–22.

---

Cell Signaling technologies: CST Pathways, Immunology and Inflammation, T Cell Receptor Signaling Pathway

- Chen, H. C.; Appeddu, P. A.; Isoda, H.; Guan, J. L. (1996): Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. In: *J Biol Chem* 271 (42), S. 26329–26334.
- Chiang, C.; Swan, R. Z.; Grachtchouk, M.; Bolinger, M.; Litingtung, Y.; Robertson, E. K. et al. (1999): Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. In: *Dev. Biol.* 205 (1), S. 1–9. DOI: 10.1006/dbio.1998.9103.
- Christoph, T.; Muller-Rover, S.; Audring, H.; Tobin, D. J.; Hermes, B.; Cotsarelis, G. et al. (2000): The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. In: *Br J Dermatol* 142 (5), S. 862–873.
- Condamine, Thomas; Gabrilovich, Dmitry I. (2011): Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. In: *Trends Immunol.* 32 (1), S. 19–25. DOI: 10.1016/j.it.2010.10.002.
- Danso-Abeam, Dina; Staats, Kim A.; Franckaert, Dean; Van Den Bosch, Ludo; Liston, Adrian; Gray, Daniel H D; Dooley, James (2013): Aire mediates thymic expression and tolerance of pancreatic antigens via an unconventional transcriptional mechanism. In: *Eur J Immunol* 43 (1), S. 75–84. DOI: 10.1002/eji.201242761.
- de Goer de Herve, Marie-Ghislaine; Cariou, Anne; Simonetta, Federico; Taoufik, Yassine (2008): Heterospecific CD4 help to rescue CD8 T cell killers. In: *J Immunol* 181 (9), S. 5974–5980.
- Dilek, N.; Poirier, N.; Hulin, P.; Coulon, F.; Mary, C.; Ville, S. et al. (2013): Targeting CD28, CTLA-4 and PD-L1 costimulation differentially controls immune synapses and function of human regulatory and conventional T-cells. In: *PLoS One* 8 (12), S. e83139. DOI: 10.1371/journal.pone.0083139.
- Dillaha, C. J.; Rothman, S. (1952): Therapeutic experiments in alopecia areata with orally administered cortisone. In: *J Am Med Assoc* 150 (6), S. 546–550.
- Dorrie, J.; Schaft, N.; Müller, I.; Wellner, V.; Schunder, T.; Hanig, J. et al. (2008): Introduction of functional chimeric E/L-selectin by RNA electroporation to target dendritic cells from blood to lymph nodes. In: *Cancer Immunol Immunother* 57 (4), S. 467–477. DOI: 10.1007/s00262-007-0385-1.



- D'Ovidio, R. (2014): Alopecia Areata: news on diagnosis, pathogenesis and treatment. In: *G Ital Dermatol Venereol* 149 (1), S. 25–45.
- Du Vivier, A.; Munro, D. D. (1975): Alopecia areata, autoimmunity, and Down's syndrome. In: *Br Med J* 1 (5951), S. 191–192.
- Duarte, S.; Shen, X-D; Fondevila, C.; Busuttill, R. W.; Coito, A. J. (2012): Fibronectin- $\alpha$ 4 $\beta$ 1 interactions in hepatic cold ischemia and reperfusion injury: regulation of MMP-9 and MT1-MMP via the p38 MAPK pathway. In: *Am J Transplant* 12 (10), S. 2689–2699. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04161.x.
- Erb, U.; Megaptche, A. P.; Gu, X.; Büchler, M. W.; Zöller, M. (2014): CD44 standard and CD44v10 isoform expression on leukemia cells distinctly influences niche embedding of hematopoietic stem cells. In: *J Hematol Oncol* 7, S. 29. DOI: 10.1186/1756-8722-7-29.
- Espinosa, Gabriel; Collado, Javier A.; Scholz, Erika; Mestre-Ferrer, Anna; Kuse, Nozomi; Takiguchi, Masafumi et al. (2013): Peptides presented by HLA class I molecules in the human thymus. In: *J Proteomics* 94, S. 23–36. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.08.023.
- Estess, P.; DeGrendele, H. C.; Pascual, V.; Siegelman, M. (1998): Functional activation of lymphocyte CD44 in peripheral blood is a marker of autoimmune disease activity. In: *J Clin Invest* 102 (6), S. 1173–1182. DOI: 10.1172/JCI4235.
- Fooksman, D. R.; Vardhana, S.; Vasiliver-Shamis, G.; Liese, J.; Blair, D. A.; Waite, J. et al. (2010): Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. In: *Annu Rev Immunol* 28, S. 79–105. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101308.
- Frentz, G. (1977): Topical treatment of extended alopecia. Intralesional steroid--Kromayer lamp. In: *Dermatologica* 155 (3), S. 147–154.
- Freyschmidt-Paul, P.; Seiter, S.; Zöller, M.; König, A.; Ziegler, A.; Sundberg, J. P. et al. (2000): Treatment with an anti-CD44v10-specific antibody inhibits the onset of alopecia areata in C3H/HeJ mice. In: *J Invest Dermatol* 115 (4), S. 653–657. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00113.x.
- Fuchs, Elaine (2007): Scratching the surface of skin development. In: *Nature* 445 (7130), S. 834–842. DOI: 10.1038/nature05659.
- Gabrilovich, Dmitry I.; Bronte, Vincenzo; Chen, Shu-Hsia; Colombo, Mario P.; Ochoa, Augusto; Ostrand-Rosenberg, Suzanne; Schreiber, Hans (2007): The terminology issue

- for myeloid-derived suppressor cells. In: *Cancer Res* 67 (1), S. 425; author reply 426. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3037.
- Galbraith, G. M.; Palesch, Y.; Gore, E. A.; Pandey, J. P. (1999): Contribution of interleukin 1beta and KM loci to alopecia areata. In: *Hum Hered* 49 (2), S. 85–89.
- Galbraith, G. M.; Pandey, J. P. (1989): Km1 allotype association with one subgroup of alopecia areata. In: *Am J Hum Genet* 44 (3), S. 426–428.
- Galbraith, G. M.; Pandey, J. P. (1995): Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene polymorphism in alopecia areata. In: *Hum Genet* 96 (4), S. 433–436.
- Galbraith, G. M.; Thiers, B. H.; Pandey, J. P. (1984): Gm allotype associated resistance and susceptibility to alopecia areata. In: *Clin Exp Immunol* 56 (1), S. 149–152.
- Gilhar, Amos; Kam, Yossi; Assy, Bedia; Kalish, Richard S. (2005): Alopecia areata induced in C3H/HeJ mice by interferon-gamma: evidence for loss of immune privilege. In: *J Invest Dermatol* 124 (1), S. 288–289. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.23580.x.
- Gilhar, Amos; Paus, Ralf; Kalish, Richard S. (2007): Lymphocytes, neuropeptides, and genes involved in alopecia areata. In: *J Clin Invest* 117 (8), S. 2019–2027. DOI: 10.1172/JCI31942.
- Goodison, S.; Urquidi, V.; Tarin, D. (1999): CD44 cell adhesion molecules. In: *Mol Pathol* 52 (4), S. 189–196.
- Guo, Y. J.; Lin, S. C.; Wang, J. H.; Bigby, M.; Sy, M. S. (1994): Palmitoylation of CD44 interferes with CD3-mediated signaling in human T lymphocytes. In: *Int Immunol* 6 (2), S. 213–221.
- Gupta, Pooja; Freyschmidt-Paul, Pia; Vitacolonna, Mario; Kiessling, Sabine; Hummel, Susanne; Hildebrand, Dagmar et al. (2006): A chronic contact eczema impedes migration of antigen-presenting cells in alopecia areata. In: *J Invest Dermatol* 126 (7), S. 1559–1573. DOI: 10.1038/sj.jid.5700328.
- Henke, C. A.; Roongta, U.; Mickelson, D. J.; Knutson, J. R.; McCarthy, J. B. (1996): CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix. In: *J Clin Invest* 97 (11), S. 2541–2552. DOI: 10.1172/JCI118702.
- Hibino, S.; Shibuya, M.; Hoffman, M. P.; Engbring, J. A.; Hossain, R.; Mochizuki, M. et al. (2005): Laminin alpha5 chain metastasis- and angiogenesis-inhibiting peptide blocks

- fibroblast growth factor 2 activity by binding to the heparan sulfate chains of CD44. In: *Cancer Res* 65 (22), S. 10494–10501. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0314.
- Highfill, Steven L.; Rodriguez, Paulo C.; Zhou, Qing; Goetz, Christine A.; Koehn, Brent H.; Veenstra, Rachelle et al. (2010): Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. In: *Blood* 116 (25), S. 5738–5747. DOI: 10.1182/blood-2010-06-287839.
- Hsu, Ya-Chieh; Pasolli, H. Amalia; Fuchs, Elaine (2011): Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. In: *Cell* 144 (1), S. 92–105. DOI: 10.1016/j.cell.2010.11.049.
- Huelsken, Joerg; Vogel, Regina; Erdmann, Bettina; Cotsarelis, George; Birchmeier, Walter (2001):  $\beta$ -Catenin Controls Hair Follicle Morphogenesis and Stem Cell Differentiation in the Skin. In: *Cell* 105 (4), S. 533–545. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00336-1.
- Hynes, R. O. (2002): Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. In: *Cell* 110 (6), S. 673–687.
- Ihrcke, N. S.; Platt, J. L. (1996): Shedding of heparan sulfate proteoglycan by stimulated endothelial cells: evidence for proteolysis of cell-surface molecules. In: *J Cell Physiol* 168 (3), S. 625–637. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199609)168:3<625::AID-JCP15>3.0.CO;2-Y.
- Ilangumaran, S.; Briol, A.; Hoessli, D. C. (1998): CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes. In: *Blood* 91 (10), S. 3901–3908.
- Isacke, C. M.; Yarwood, H. (2002): The hyaluronan receptor, CD44. In: *Int J Biochem Cell Biol* 34 (7), S. 718–721.
- Ito, S.; Wakamatsu, K. (2011): Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. In: *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25 (12), S. 1369–1380. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2011.04278.x.
- Ito, Taisuke; Ito, Natsuho; Saatoff, Matthias; Hashizume, Hideo; Fukamizu, Hidekazu; Nickoloff, Brian J. et al. (2008): Maintenance of hair follicle immune privilege is linked to prevention of NK cell attack. In: *J Invest Dermatol* 128 (5), S. 1196–1206. DOI: 10.1038/sj.jid.5701183.

- Jackson, D. G.; Bell, J. I.; Dickinson, R.; Timans, J.; Shields, J.; Whittle, N. (1995): Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. In: *J Cell Biol* 128 (4), S. 673–685.
- Kalish, Richard S.; Gilhar, Amos (2003): Alopecia areata: autoimmunity--the evidence is compelling. In: *J Invest Dermatol Symp Proc* 8 (2), S. 164–167. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2003.00802.x.
- Kemp, E. H.; Sandhu, H. K.; Weetman, A. P.; McDonagh, A. J. (2011): Demonstration of autoantibodies against tyrosine hydroxylase in patients with alopecia areata. In: *Br J Dermatol* 165 (6), S. 1236–1243. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10597.x.
- Knudson, W.; Knudson, C. B. (1999): The Hyaluronan Receptor CD44. In: *Glycoforum*. Online verfügbar unter <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hapdf/HA10.pdf>, zuletzt geprüft am 02.06.2014.
- Koffeman, Eva C.; Genovese, Mark; Amox, Diane; Keogh, Elissa; Santana, Ernesto; Matteson, Eric L. et al. (2009): Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. In: *Arthritis Rheum* 60 (11), S. 3207–3216. DOI: 10.1002/art.24916.
- Kos, Liborka; Conlon, Joseph (2009): An update on alopecia areata. In: *Curr. Opin. Pediatr.* 21 (4), S. 475–480. DOI: 10.1097/MOP.0b013e32832db986.
- Kugelman, L. C.; Ganguly, S.; Haggerty, J. G.; Weissman, S. M.; Milstone, L. M. (1992): The core protein of epican, a heparan sulfate proteoglycan on keratinocytes, is an alternative form of CD44. In: *J Invest Dermatol* 99 (6), S. 886–891.
- Langbein, Lutz; Rogers, Michael A.; Praetzel, Silke; Aoki, Noriaki; Winter, Hermelita; Schweizer, Jurg (2002): A novel epithelial keratin, hK6irs1, is expressed differentially in all layers of the inner root sheath, including specialized huxley cells (Flugelzellen) of the human hair follicle. In: *J Invest Dermatol* 118 (5), S. 789–799. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01711.x.
- Langbein, Lutz; Rogers, Michael A.; Praetzel-Wunder, Silke; Helmke, Burkhard; Schirmacher, Peter; Schweizer, Jurg (2006): K25 (K25irs1), K26 (K25irs2), K27 (K25irs3), and K28 (K25irs4) represent the type I inner root sheath keratins of the

- human hair follicle. In: *J Invest Dermatol* 126 (11), S. 2377–2386. DOI: 10.1038/sj.jid.5700494.
- Langbein, Lutz; Spring, Herbert; Rogers, Michael A.; Praetzel, Silke; Schweizer, Juergen (2004): Hair keratins and hair follicle-specific epithelial keratins. In: *Methods Cell Biol* 78, S. 413–451.
- Lanzavecchia, A.; Sallusto, F. (2005): Understanding the generation and function of memory T cell subsets. In: *Curr Opin Immunol* 17 (3), S. 326–332. DOI: 10.1016/j.coi.2005.04.010.
- Leung, Man Ching; Sutton, Chris W.; Fenton, David A.; Tobin, Desmond J. (2010): Trichohyalin is a potential major autoantigen in human alopecia areata. In: *J. Proteome Res.* 9 (10), S. 5153–5163. DOI: 10.1021/pr100422u.
- Li, H.; Wang, D. (2014): Streptococcus mutans wall-associated protein A promotes TLR4-induced dendritic cell maturation. In: *Scand J Immunol.* DOI: 10.1111/sji.12194.
- Liao, W.; Lin, J.-X.; Wang, L.; Li, P.; Leonard, W. J. (2011): Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. In: *Nat Immunol* 12 (6), S. 551–559. DOI: 10.1038/ni.2030.
- Lu, Wei; Shapiro, Jerry; Yu, Mei; Barekattain, Armin; Lo, Blanche; Finner, Andreas; McElwee, Kevin (2006): Alopecia areata: pathogenesis and potential for therapy. In: *Expert Rev Mol Med* 8 (14), S. 1–19. DOI: 10.1017/S146239940601101X.
- Lund, S. A.; Wilson, C. L.; Raines, E. W.; Tang, J.; Giachelli, C. M.; Scatena, M. (2013): Osteopontin mediates macrophage chemotaxis via  $\alpha 4$  and  $\alpha 9$  integrins and survival via the  $\alpha 4$  integrin. In: *J. Cell. Biochem.* 114 (5), S. 1194–1202. DOI: 10.1002/jcb.24462.
- Lutz, M. B.; Schuler, G. (2002): Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? In: *Trends Immunol* 23 (9), S. 445–449.
- Lutz, Manfred B.; Kurts, Christian (2009): Induction of peripheral CD4+ T-cell tolerance and CD8+ T-cell cross-tolerance by dendritic cells. In: *Eur. J. Immunol.* 39 (9), S. 2325–2330. DOI: 10.1002/eji.200939548.
- Manzo, A.; Bugatti, S.; Caporali, R.; Prevo, R.; Jackson, D. G.; Uguccioni, M. et al. (2007): CCL21 expression pattern of human secondary lymphoid organ stroma is conserved in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. In: *Am J Pathol* 171 (5), S. 1549–1562. DOI: 10.2353/ajpath.2007.061275.

- Marhaba, R.; Freyschmidt-Paul, P.; Zöller, M. (2006): In vivo CD44-CD49d complex formation in autoimmune disease has consequences on T cell activation and apoptosis resistance. In: *Eur J Immunol* 36 (11), S. 3017–3032. DOI: 10.1002/eji.200636158.
- Marhaba, Rachid; Vitacolonna, Mario; Hildebrand, Dagmar; Baniyash, Michal; Freyschmidt-Paul, Pia; Zoller, Margot (2007): The importance of myeloid-derived suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema. In: *J Immunol* 179 (8), S. 5071–5081.
- Marigo, Ilaria; Dolcetti, Luigi; Serafini, Paolo; Zanovello, Paola; Bronte, Vincenzo (2008): Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. In: *Immunol. Rev.* 222, S. 162–179. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00602.x.
- McElwee, K. J.; Boggess, D.; King, L E Jr; Sundberg, J. P. (1998): Experimental induction of alopecia areata-like hair loss in C3H/HeJ mice using full-thickness skin grafts. In: *J Invest Dermatol* 111 (5), S. 797–803. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00380.x.
- McElwee, K. J.; Hoffmann, R. (2002): Alopecia areata - animal models. In: *Clin Exp Dermatol* 27 (5), S. 410–417.
- McElwee, K. J.; Spiers, E. M.; Oliver, R. F. (1996): In vivo depletion of CD8+ T cells restores hair growth in the DEBR model for alopecia areata. In: *Br J Dermatol* 135 (2), S. 211–217.
- McElwee, K. J.; Spiers, E. M.; Oliver, R. F. (1999): Partial restoration of hair growth in the DEBR model for Alopecia areata after in vivo depletion of CD4+ T cells. In: *Br J Dermatol* 140 (3), S. 432–437.
- McElwee, Kevin J.; Freyschmidt-Paul, Pia; Hoffmann, Rolf; Kissling, Sabine; Hummel, Susanne; Vitacolonna, Mario; Zoller, Margot (2005): Transfer of CD8(+) cells induces localized hair loss whereas CD4(+)/CD25(-) cells promote systemic alopecia areata and CD4(+)/CD25(+) cells blockade disease onset in the C3H/HeJ mouse model. In: *J Invest Dermatol* 124 (5), S. 947–957. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23692.x.
- McElwee, Kevin J.; Freyschmidt-Paul, Pia; Sundberg, John P.; Hoffmann, Rolf (2003): The pathogenesis of alopecia areata in rodent models. In: *J Investig Dermatol Symp Proc* 8 (1), S. 6–11. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12164.x.
- Miller, Stephen D.; Turley, Danielle M.; Podojil, Joseph R. (2007): Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease. In: *Nat Rev Immunol* 7 (9), S. 665–677. DOI: 10.1038/nri2153.

- Moll, R.; Franke, W. W.; Schiller, D. L.; Geiger, B.; Krepler, R. (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. In: *Cell* 31 (1), S. 11–24.
- Moll, Roland; Divo, Markus; Langbein, Lutz (2008): The human keratins: biology and pathology. In: *Histochem. Cell Biol.* 129 (6), S. 705–733. DOI: 10.1007/s00418-008-0435-6.
- Montes, L. F. (1977): Topical halcinonide in alopecia areata and in alopecia totalis. In: *J Cutan Pathol* 4 (2), S. 47–50.
- Moser, M.; Legate, K. R.; Zent, R.; Fässler, R. (2009): The tail of integrins, talin, and kindlins. In: *Science* 324 (5929), S. 895–899. DOI: 10.1126/science.1163865.
- Muller, Sylviane; Monneaux, Fanny; Schall, Nicolas; Rashkov, Rasho K.; Oparanov, Boycho A.; Wiesel, Philippe et al. (2008): Spliceosomal peptide P140 for immunotherapy of systemic lupus erythematosus: results of an early phase II clinical trial. In: *Arthritis Rheum* 58 (12), S. 3873–3883. DOI: 10.1002/art.24027.
- Naeem, M.; Wajid, M.; Lee, K.; Leal, S. M.; Ahmad, W. (2006): A mutation in the hair matrix and cuticle keratin KRT5B5 gene causes ectodermal dysplasia of hair and nail type. In: *J Med Genet* 43 (3), S. 274–279. DOI: 10.1136/jmg.2005.033381.
- Nandi, A.; Estess, P.; Siegelman, M. (2004): Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. In: *Immunity* 20 (4), S. 455–465.
- Niu, G. (2011): Why Integrin as a Primary Target for Imaging and Therapy. In: *Theranostics*, S. 30. DOI: 10.7150/thno/v01p0030.
- Obermajer, Nataša; Kalinski, Pawel (2012): Generation of myeloid-derived suppressor cells using prostaglandin E2. In: *Transplant Res* 1 (1), S. 15. DOI: 10.1186/2047-1440-1-15.
- Oshima, Hideo; Rochat, Ariane; Kedzia, Cécile; Kobayashi, Koji; Barrandon, Yann (2001): Morphogenesis and Renewal of Hair Follicles from Adult Multipotent Stem Cells. In: *Cell* 104 (2), S. 233–245. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00208-2.
- Paus, R.; Slominski, A.; Czarnetzki, B. M. (1993): Is alopecia areata an autoimmune-response against melanogenesis-related proteins, exposed by abnormal MHC class I expression in the anagen hair bulb? In: *Yale J Biol Med* 66 (6), S. 541–554.

- Paus, Ralf; Ito, Natsuhiko; Takigawa, Masahiro; Ito, Taisuke (2003): The hair follicle and immune privilege. In: *J Invest Dermatol Symp Proc* 8 (2), S. 188–194. DOI: 10.1046/j.1087-0024.2003.00807.x.
- Peck, D.; Isacke, C. M. (1996): CD44 phosphorylation regulates melanoma cell and fibroblast migration on, but not attachment to, a hyaluronan substratum. In: *Curr Biol* 6 (7), S. 884–890.
- Perret, C.; Wiesner-Menzel, L.; Happle, R. (1984): Immunohistochemical analysis of T-cell subsets in the peribulbar and intrabulbar infiltrates of alopecia areata. In: *Acta Derm Venereol* 64 (1), S. 26–30.
- Perrin, C.; Langbein, L.; Schweizer, J. (2004): Expression of hair keratins in the adult nail unit: an immunohistochemical analysis of the onychogenesis in the proximal nail fold, matrix and nail bed. In: *Br J Dermatol* 151 (2), S. 362–371. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2004.06108.x.
- Petukhova, Lynn; Duvic, Madeleine; Hordinsky, Maria; Norris, David; Price, Vera; Shimomura, Yutaka et al. (2010): Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. In: *Nature* 466 (7302), S. 113–117. DOI: 10.1038/nature09114.
- Plikus, Maksim V.; Baker, Ruth E.; Chen, Chih-Chiang; Fare, Clyde; de la Cruz, Damon; Andl, Thomas et al. (2011): Self-organizing and stochastic behaviors during the regeneration of hair stem cells. In: *Science* 332 (6029), S. 586–589. DOI: 10.1126/science.1201647.
- Plikus, Maksim V.; Mayer, Julie Ann; de la Cruz, Damon; Baker, Ruth E.; Maini, Philip K.; Maxson, Robert; Chuong, Cheng-Ming (2008): Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. In: *Nature* 451 (7176), S. 340–344. DOI: 10.1038/nature06457.
- Reiter, H. (1979): Effect of thymidine on the survival of mice with EL4 tumors. In: *Cancer Res* 39 (12), S. 4856–4860.
- Rendl, Michael; Lewis, Lisa; Fuchs, Elaine (2005): Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle. In: *PLoS Biol* 3 (11), S. e331. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030331.
- Rogers, Michael A.; Edler, Lutz; Winter, Hermelita; Langbein, Lutz; Beckmann, Iris; Schweizer, Jürgen (2005): Characterization of new members of the human type II ker-



- atin gene family and a general evaluation of the keratin gene domain on chromosome 12q13.13. In: *J Invest Dermatol* 124 (3), S. 536–544. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.23530.x.
- Rogers, Michael A.; Langbein, Lutz; Praetzel-Wunder, Silke; Winter, Hermelita; Schweizer, Jurgen (2006): Human hair keratin-associated proteins (KAPs). In: *Int Rev Cytol* 251, S. 209–263. DOI: 10.1016/S0074-7696(06)51006-X.
- Rogers, Michael A.; Winter, Hermelita; Langbein, Lutz; Bleiler, Raphael; Schweizer, Jurgen (2004): The human type I keratin gene family: characterization of new hair follicle specific members and evaluation of the chromosome 17q21.2 gene domain. In: *Differentiation* 72 (9-10), S. 527–540. DOI: 10.1111/j.1432-0436.2004.07209006.x.
- Rokhsar, C. K.; Shupack, J. L.; Vafai, J. J.; Washenik, K. (1998): Efficacy of topical sensitizers in the treatment of alopecia areata. In: *J Am Acad Dermatol* 39 (5 Pt 1), S. 751–761.
- Ruegg, C.; Mariotti, A. (2003): Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. In: *Cell Mol Life Sci* 60 (6), S. 1135–1157. DOI: 10.1007/s00018-003-2297-3.
- Sabatos-Peyton, Catherine A.; Verhagen, Johan; Wraith, David C. (2010): Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases. In: *Curr. Opin. Immunol.* 22 (5), S. 609–615. DOI: 10.1016/j.coi.2010.08.006.
- Safavi, K. H.; Muller, S. A.; Suman, V. J.; Moshell, A. N.; Melton, L J 3rd (1995): Incidence of alopecia areata in Olmsted County, Minnesota, 1975 through 1989. In: *Mayo Clin Proc* 70 (7), S. 628–633. DOI: 10.1016/S0025-6196(11)63913-X.
- Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. (2008): Regulatory T cells and immune tolerance. In: *Cell* 133 (5), S. 775–787. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009.
- Salam, N.; Rane, S.; Das, R.; Faulkner, M.; Gund, R.; Kandpal, U. et al. (2013): T cell ageing: effects of age on development, survival & function. In: *Indian J Med Res* 138 (5), S. 595–608.
- Sambandam, A.; Maillard, I.; Zediak, V. P.; Xu, L.; Gerstein, R. M.; Aster, J. C. et al. (2005): Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. In: *Nat Immunol* 6 (7), S. 663–670. DOI: 10.1038/ni1216.

- Saraiva, Margarida; Christensen, Jillian R.; Veldhoen, Marc; Murphy, Theresa L.; Murphy, Kenneth M.; O'Garra, Anne (2009): Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. In: *Immunity* 31 (2), S. 209–219. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.05.012.
- Schaller, M. D.; Otey, C. A.; Hildebrand, J. D.; Parsons, J. T. (1995): Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. In: *J Cell Biol* 130 (5), S. 1181–1187.
- Schlaepfer, D. D.; Hanks, S. K.; Hunter, T.; van der Geer, P. (1994): Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. In: *Nature* 372 (6508), S. 786–791.
- Schmidt-Ullrich, Ruth; Paus, Ralf (2005): Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. In: *Bioessays* 27 (3), S. 247–261. DOI: 10.1002/bies.20184.
- Schneider, Marlon R.; Schmidt-Ullrich, Ruth; Paus, Ralf (2009): The hair follicle as a dynamic miniorgan. In: *Curr. Biol.* 19 (3), S. R132-42. DOI: 10.1016/j.cub.2008.12.005.
- Schweizer, Jurgen; Bowden, Paul E.; Coulombe, Pierre A.; Langbein, Lutz; Lane, E. Birgitte; Magin, Thomas M. et al. (2006): New consensus nomenclature for mammalian keratins. In: *J Cell Biol* 174 (2), S. 169–174. DOI: 10.1083/jcb.200603161.
- Schweizer, Jurgen; Langbein, Lutz; Rogers, Michael A.; Winter, Hermelita (2007): Hair follicle-specific keratins and their diseases. In: *Exp Cell Res* 313 (10), S. 2010–2020. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.02.032.
- Seiter, S.; Schadendorf, D.; Tilgen, W.; Zöller, M. (1998): CD44 variant isoform expression in a variety of skin-associated autoimmune diseases. In: *Clin Immunol Immunopathol* 89 (1), S. 79–93.
- Seiter, S.; Ugurel, S.; Tilgen, W.; Reinhold, U. (2001): High-dose pulse corticosteroid therapy in the treatment of severe alopecia areata. In: *Dermatology* 202 (3), S. 230–234.
- Singh, Gurcharan; Lavanya, Ms (2010): Topical immunotherapy in alopecia areata. In: *Int J Trichology* 2 (1), S. 36–39. DOI: 10.4103/0974-7753.66911.
- Singh, Vibhuti; Mueller, Ulrike; Freyschmidt-Paul, Pia; Zöller, Margot (2011): Delayed type hypersensitivity-induced myeloid-derived suppressor cells regulate autoreactive T cells. In: *Eur. J. Immunol.* 41 (10), S. 2871–2882. DOI: 10.1002/eji.201141696.

- Singh, Vibhuti: Dissertation "Attending persistent T cell activation in Alopecia areata: A therapeutic option ". Karlsruher Institut für Technologie, 2011
- Slominski, Andrzej; Wortsman, Jacobo; Plonka, Przemyslaw M.; Schallreuter, Karin U.; Paus, Ralf; Tobin, Desmond J. (2005): Hair follicle pigmentation. In: *J Invest Dermatol* 124 (1), S. 13–21. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.23528.x.
- Smith, Cassandra E.; Eagar, Todd N.; Strominger, Jack L.; Miller, Stephen D. (2005): Differential induction of IgE-mediated anaphylaxis after soluble vs. cell-bound tolerogenic peptide therapy of autoimmune encephalomyelitis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (27), S. 9595–9600. DOI: 10.1073/pnas.0504131102.
- Smith-Garvin, J. E.; Koretzky, G. A.; Jordan, M. S. (2009): T cell activation. In: *Annu Rev Immunol* 27, S. 591–619. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
- Sospedra, M.; Martin, R. (2005): Immunology of multiple sclerosis. In: *Annu Rev Immunol* 23, S. 683–747. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707.
- Stenn, K. S.; Paus, R. (2001): Controls of hair follicle cycling. In: *Physiol Rev* 81 (1), S. 449–494.
- Sulaimon, Shola S.; Kitchell, Barbara E. (2003): The biology of melanocytes. In: *Vet Dermatol* 14 (2), S. 57–65.
- Sundberg, J. P.; Cordy, W. R.; King, L E Jr (1994): Alopecia areata in aging C3H/HeJ mice. In: *J Invest Dermatol* 102 (6), S. 847–856.
- Tarlow, J. K.; Clay, F. E.; Cork, M. J.; Blakemore, A. I.; McDonagh, A. J.; Messenger, A. G.; Duff, G. W. (1994): Severity of alopecia areata is associated with a polymorphism in the interleukin-1 receptor antagonist gene. In: *J Invest Dermatol* 103 (3), S. 387–390.
- Taylor, C. R.; Hawk, J. L. (1995): PUVA treatment of alopecia areata partialis, totalis and universalis: audit of 10 years' experience at St John's Institute of Dermatology. In: *Br J Dermatol* 133 (6), S. 914–918.
- Taylor, G.; Lehrer, M. S.; Jensen, P. J.; Sun, T. T.; Lavker, R. M. (2000): Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. In: *Cell* 102 (4), S. 451–461.
- Teraki, Y.; Imanishi, K.; Shiohara, T. (1996): Cytokines in alopecia areata: contrasting cytokine profiles in localized form and extensive form (alopecia universalis). In: *Acta Derm Venereol* 76 (6), S. 421–423.

- Thrower, S. L.; James, L.; Hall, W.; Green, K. M.; Arif, S.; Allen, J. S. et al. (2009): Proinsulin peptide immunotherapy in type 1 diabetes: report of a first-in-man Phase I safety study. In: *Clin Exp Immunol* 155 (2), S. 156–165. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2008.03814.x.
- Tobin, Desmond J. (2014): Alopecia areata and vitiligo - partners in crime or a case of false alibis. In: *Exp Dermatol* 23 (3), S. 153–154. DOI: 10.1111/exd.12309.
- Tomar, A.; Schlaepfer, D. D. (2009): Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. In: *Curr Opin Cell Biol* 21 (5), S. 676–683. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.05.006.
- Tong, Xuemei; Coulombe, Pierre A. (2006): Keratin 17 modulates hair follicle cycling in a TNFalpha-dependent fashion. In: *Genes Dev* 20 (10), S. 1353–1364. DOI: 10.1101/gad.1387406.
- Tsukita, S.; Oishi, K.; Sato, N.; Sagara, J.; Kawai, A. (1994): ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. In: *J Cell Biol* 126 (2), S. 391–401.
- Vanderlugt, Carol L.; Miller, Stephen D. (2002): Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. In: *Nat Rev Immunol* 2 (2), S. 85–95. DOI: 10.1038/nri724.
- Wang, Zhiling; Wong, Pauline; Langbein, Lutz; Schweizer, Jurgen; Coulombe, Pierre A. (2003): Type II epithelial keratin 6hf (K6hf) is expressed in the companion layer, matrix, and medulla in anagen-stage hair follicles. In: *J Invest Dermatol* 121 (6), S. 1276–1282. DOI: 10.1111/j.1523-1747.2003.12644.x.
- Warren, K. G.; Catz, I.; Ferenczi, L. Z.; Krantz, M. J. (2006): Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment. In: *Eur J Neurol* 13 (8), S. 887–895. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2006.01533.x.
- Waschke, Jens (2008): The desmosome and pemphigus. In: *Histochem. Cell Biol.* 130 (1), S. 21–54. DOI: 10.1007/s00418-008-0420-0.
- Watanabe, Norihiko; Wang, Yi-Hong; Lee, Heung Kyu; Ito, Tomoki; Wang, Yui-Hsi; Cao, Wei; Liu, Yong-Jun (2005): Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce

- CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. In: *Nature* 436 (7054), S. 1181–1185. DOI: 10.1038/nature03886.
- Weber, B.; Rösel, M.; Arch, R.; Möller, P.; Zöller, M. (1996): Transient expression of CD44 variant isoforms in the ontogeny of the rat: ectoderm-, endoderm- and mesoderm-derived cells express different exon combinations. In: *Differentiation* 60 (1), S. 17–29. DOI: 10.1046/j.1432-0436.1996.6010017.x.
- Wengraf, D. A.; McDonagh, A J G; Lovewell, T R J; Vasilopoulos, Y.; Macdonald-Hull, S. P.; Cork, M. J. et al. (2008): Genetic analysis of autoimmune regulator haplotypes in alopecia areata. In: *Tissue Antigens* 71 (3), S. 206–212. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2007.00992.x.
- Winter, Hermelita; Schissel, Daniel; Parry, David A D; Smith, Thomasin A.; Liovic, Mirjana; Birgitte Lane, E. et al. (2004): An unusual Ala12Thr polymorphism in the 1A alpha-helical segment of the companion layer-specific keratin K6hf: evidence for a risk factor in the etiology of the common hair disorder pseudofolliculitis barbae. In: *J Invest Dermatol* 122 (3), S. 652–657. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.22309.x.
- Wittig, B.; Schwarzler, C.; Fohr, N.; Gunthert, U.; Zöller, M. (1998): Curative treatment of an experimentally induced colitis by a CD44 variant V7-specific antibody. In: *J Immunol* 161 (3), S. 1069–1073.
- Wong, D.J. and Chang, H.Y. Skin tissue engineering (March 31, 2009), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook
- Wu, X.; Gan, B.; Yoo, Y.; Guan, J.-L. (2005): FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. In: *Dev Cell* 9 (2), S. 185–196. DOI: 10.1016/j.devcel.2005.06.006.
- Xie, Z.; Pimental, D. R.; Lohan, S.; Vasertriger, A.; Pligavko, C.; Colucci, W. S.; Singh, K. (2001): Regulation of angiotensin II-stimulated osteopontin expression in cardiac microvascular endothelial cells: role of p42/44 mitogen-activated protein kinase and reactive oxygen species. In: *J Cell Physiol* 188 (1), S. 132–138. DOI: 10.1002/jcp.1104.
- Xu, W.; Jia, S.; Xie, P.; Zhong, A.; Galiano, Robert D.; Mustoe, T. A.; Hong, S. J. (2014): The expression of proinflammatory genes in epidermal keratinocytes is regulated by hydration status. In: *J Invest Dermatol* 134 (4), S. 1044-55; quiz e15. DOI: 10.1038/jid.2013.425.

- Yoshinari, C.; Mizusawa, N.; Byers, H. R.; Akasaka, T. (1999): CD44 variant isoform CD44v10 expression of human melanoma cell lines is upregulated by hyaluronate and correlates with migration. In: *Melanoma Res* 9 (3), S. 223–231.
- Youn, Je-In; Nagaraj, Srinivas; Collazo, Michelle; Gabrilovich, Dmitry I. (2008): Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. In: *J Immunol* 181 (8), S. 5791–5802.
- Zhang, J. G.; Oliver, R. F. (1994): Immunohistological study of the development of the cellular infiltrate in the pelage follicles of the DEBR model for alopecia areata. In: *Br J Dermatol* 130 (4), S. 405–414.
- Zhou, Xiaohui; Kong, Ning; Zou, Hejian; Brand, David; Li, Xianpei; Liu, Zhongmin; Zheng, Song Guo (2011): Therapeutic potential of TGF-beta-induced CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells in autoimmune diseases. In: *Autoimmunity* 44 (1), S. 43–50. DOI: 10.3109/08916931003782163.
- Zhu, Bing; Bando, Yoshio; Xiao, Sheng; Yang, Kaiyong; Anderson, Ana C.; Kuchroo, Vijay K.; Khoury, Samia J. (2007): CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *J Immunol* 179 (8), S. 5228–5237.
- Zöller, M. (2011): CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? In: *Nat Rev Cancer* 11 (4), S. 254–267. DOI: 10.1038/nrc3023.
- Zöller, M.; Gupta, P.; Marhaba, R.; Vitacolonna, M.; Freyschmidt-Paul, P. (2007): Anti-CD44-mediated blockade of leukocyte migration in skin-associated immune diseases. In: *J Leukoc Biol* 82 (1), S. 57–71. DOI: 10.1189/jlb.0107063.
- Zöller, M.; McElwee, K. J.; Engel, P.; Hoffmann, R. (2002): Transient CD44 variant isoform expression and reduction in CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells in C3H/HeJ mice with alopecia areata. In: *J Invest Dermatol* 118 (6), S. 983–992. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01745.x.

## 7 Danksagung

Ich danke...

Prof. Dr. Margot Zöller für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas sowie die engagierte und geduldige Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Andrew Cato für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Jörg Kämper für die Begutachtung meiner Arbeit.

den Post-Docs, Doktoranden, Diplomanden und technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe Prof. Zöller für die Anregungen und Diskussionen zur Unterstützung meiner Arbeit sowie die angenehme Atmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

Dr. Pia Freyschmidt-Paul und den Tierpflegern der Universität Marburg für die Hilfe.

meiner Familie für die Unterstützung und Liebe, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

---

## 8 Lebenslauf

### **Persönliche Angaben**

Name: Ulrike Erb, geb. Müller

Adresse: Bergstr. 34B  
69221 Dossenheim

Geburtstag, -ort: 22.9.1983, Altdöbern

### **Schulische Ausbildung**

1990 - 1996 Grundschule Kolkwitz

1996 - 2000 Spreeland Gymnasium, Cottbus

2000 - 2003 Max-Steenbeck Gymnasium, Cottbus

### **Studium**

2003- 2009 Diplom-Studium: Biochemie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU)

2007 – 2008 Diplomarbeit im Institut für medizinische Immunologie, med. Fakultät der  
MLU  
Betreuung: Prof. B. Seliger  
Thema: Zytokinabhängige Regulation der B7-H-Moleküle in Melanom und  
Nierenzellkarzinom

### **Dissertation**

seit 2009 Promotion am Karlsruher Institut für Technologie

Thema: Autoimmunerkrankungen erfordern eine kombinierte Therapie aus To-  
leranzinduktion und Immunsuppression, Modelluntersuchung bei der  
Alopecia Areata

Betreuung: Prof. A. Cato, Prof. M. Zöller

Experimentelle Chirurgie  
AG Tumorzellbiologie  
Universitätsklinikum Heidelberg



## 9 Publikationen

### **CD44v10, osteopontin and lymphoma growth retardation by a CD44v10-specific antibody.**

Megaptche AP, Erb U, Büchler MW, Zöller M.  
Immunol Cell Biol. 2014 Jun 17, [Epub ahead of print]

### **CD44 standard and CD44v10 isoform expression on leukemia cells distinctly influences niche embedding of hematopoietic stem cells.**

Erb U, Megaptche AP, Gu X, Büchler MW, Zöller M  
J Hematol Oncol. 2014 Mar 31;7:29

### **Cooperativity of CD44 and CD49d in leukemia cell homing, migration, and survival offers a means for therapeutic attack.**

Singh V, Erb U, Zöller M  
J Immunol. 2013 Nov 15;191(10)

### **Tolerance induction by hair-specific keratins in murine alopecia areata.**

Erb U, Freyschmidt-Paul P, Zöller M  
J Leukoc Biol. 2013 Oct;94(4)

### **Delayed type hypersensitivity-induced myeloid-derived suppressor cells regulate autoreactive T cells.**

Singh V, Mueller U, Freyschmidt-Paul P, Zöller M  
Eur J Immunol. 2011 Oct;41(10)

### **Tumor exosome-loaded dendritic cells display improved vaccine efficacy in mice**

Gu X, Erb U, Büchler M W, Zöller M (submitted)

## Poster/ Vortrag

### **Towards a personalized immunotherapy by vaccination with exosome-loaded dendritic cells**

Ulrike Erb, Xiaoyu Gu, Margot Zöller, 12<sup>th</sup> annual meeting of the Association for Cancer Immunotherapy (CIMT), 2014, Poster

### **CD44v10, osteopontin and leukemia growth retardation by a CD44v10-specific Antibody**

Ulrike Erb, Amelie Pajip Megaptche, Margot Zöller, 12<sup>th</sup> annual meeting of the Association for Cancer Immunotherapy (CIMT), 2014, Poster

### **Hair-specific keratins as autoantigens in Alopecia Areata**

Ulrike Erb, Pia Freyschmidt-Paul, Margot Zöller, 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology (ICI), Mailand 2013, Vortrag

### **Tumor exosomes and immunotherapy**

Ulrike Erb, Xiaoyu Gu, Daniela Zech, Markus W. Büchler, Margot Zöller, 11<sup>th</sup> annual meeting of the Association for Cancer Immunotherapy (CIMT), 2013, Poster

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht und noch keinem Prüfungsausschuss vorgelegt worden. Die Satzung der Universität Karlsruhe/ KIT (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung wurde beachtet.

Dossenheim, den 04.06.2014

Ulrike Erb