

Charakterisierung der Rolle von NKG2D als Teil der fehlregulierten angeborenen Immunität im kutanen Lupus erythematodes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Gero Sebastian Vorwerk
aus Lohne (Oldenburg)

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Wenzel
2. Gutachter: PD Dr. MUDr. Valentin Schäfer

Tag der Mündlichen Prüfung: 31.01.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. Thomas Bieber

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Deutsche Zusammenfassung	8
1.1	Einleitung	8
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	11
1.4	Diskussion	13
1.5	Zusammenfassung	15
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	16
2.	Veröffentlichung	19
	Abstract	19
	Background	20
	Experimental design	20
	Results	22
	Discussion	22
	References	23
	Appendix	25
3.	Danksagung	29

Abkürzungsverzeichnis

CD	Unterscheidungsgruppen
CDLE	Chronisch diskoider Lupus erythematoses
CLE	Kutaner Lupus erythematoses
CXCL11	C-X-C Motiv Chemokin 11
CXCL9	C-X-C Motiv Chemokin 9
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Adler Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetales Kalbsserum
HaCaT	immortalisierte Keratinozyten
HC	Gesunde Kontrolle
ID	Interface Dermatitis
IHC	Immunhistochemie
KEGG	Kyoto Enzyklopädie von Genen und Genomen
MICA	MHC class I polypeptide- related sequence A- Protein
MICB	MHC class I polypeptide- related sequence B- Protein
mRNA	Boten- Ribonukleinsäure
NKG2D	Natural killer group 2D- Rezeptor
NOD- like	Nukleotid- bindende- Oligomerisations- Domäne- Rezeptor
Poly (dA:dT)	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
RIG-I-like	Retinolsäure- induzierbares- Gen- Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure

SCLE	Subakut kutaner Lupus erythematodes
ULBP2	UL16- bindendes- Protein 2

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Der Lupus erythematoses ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die sich auf die Haut beschränken, aber auch einen systemischen Befall zeigen kann. Bis zu 85 % der Patienten mit systemischer Manifestation weisen im Verlauf auch eine Hautbeteiligung auf (Uva et al., 2012). Der kutane Lupus erythematoses (CLE) wird nach klinischem Bild in 3 Subtypen unterteilt, den akut kutanen Lupus erythematoses, den subakut kutanen Lupus erythematoses (SCLE) und den chronisch kutanen Lupus erythematoses. Der häufigste Subtyp des chronisch kutanen Lupus erythematoses ist der chronisch diskoidale Lupus erythematoses (CDLE), der sich klinisch durch Ausbildung scheinbar runder erythematöser Plaques vor allem im Gesicht und eine narbige Abheilung auszeichnet. (Kuhn et al., 2016; Werth, 2005). Pathomechanisch wird im CLE eine zytotoxische T-Zell-vermittelte Autoimmunität gegen Keratinozyten vermutet, die durch eine Aktivierung zytosolischer Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) und immunologischer Signalwege des angeborenen Immunsystems ausgelöst und aufrechterhalten wird (Scholtissek et al., 2017; Sarkar et al., 2018). Keratinozyten fördern die entzündlichen Vorgänge im CLE durch Ausschüttung von Interferonen und Interferon-gesteuerter Zytokine. Diese Zytokinausschüttung kann in vitro durch Transfektion von Keratinozyten mit zytosolischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) ausgelöst werden, was einen relevanten Pathomechanismus in CLE darstellt (Zahn et al., 2011; Scholtissek et al., 2017). Histopathologisch äußert sich die gegen Keratinozyten gerichtete zytotoxische Autoimmunität als vakuoläre Degeneration von Keratinozyten der Basalschicht in CLE-Läsionen, eine sogenannte Interface Dermatitis (ID) (Wenzel und Tüting, 2008).

In einer Genom-weiten Assoziationsstudie wurden die Gene für zytotoxischen Marker MHC class I polypeptide-related sequence A- und B-Protein (MICA und MICB) mit einer erhöhten Suszeptibilität für CLE in Verbindung gebracht (Kunz et al., 2015). MICA und MICB sind Liganden für das Rezeptorprotein Natural killer group 2D-Rezeptor (NKG2D). Der NKG2D-Rezeptor wird im Menschen auf der Oberfläche von NK-Zellen und Unterscheidungsgruppe (CD)8⁺T-Zellen exprimiert. Auf NK-Zellen wird ein direkter Einfluss auf die Zytotoxizität beschrieben, wobei NKG2D-Rezeptoren in T-Zellen

vermutlich viel mehr eine kostimulierende Funktion ausüben (Ehrlich et al., 2005; Maasho et al., 2005).

Die Idee zur Untersuchung der Relevanz von NKG2D in CLE fußte auf Microarray-Untersuchungen in CLE- Läsionen nach Lasermikrodissektion, in denen NKG2D zu den am stärksten exprimierten zytotoxischen Markern im entzündlichen Lupusinfiltrat zählte. Ich untersuchte die mir von Professor Wenzel bereitgestellten Expressionsdaten weiter mittels KEGG- Analyse. Daraufhin nahm ich mittels Immunhistochemie (IHC) Färbungen in CLE- Läsionen zum direkten Nachweis von NKG2D und seinem Liganden MICB vor. Um einen funktionellen Zusammenhang zwischen Pathomechanismen in CLE und NKG2D herzustellen, transfizierte ich Keratinozyten mit DNA und untersuchte die immunologische Reaktion mittels Hochdurchsatz-Screening auf Genexpressionsebene.

Dieses Manuskript erarbeitet so die Frage, ob NKG2D und seine Liganden im CLE exprimiert werden und welche potenzielle Rolle diese Proteine bei der Pathogenese von CLE und der für diese Krankheit charakteristischen Zytotoxizität spielen.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Probengewinnung

Für die Genexpressionsanalyse wurden sechs Patienten mit CDLE jeweils zwei 4mm große Hautstanzen aus erkrankten Arealen der Haut entnommen. Nach Entnahme wurde eine Stanze in flüssigem Stickstoff gefroren, die andere über Nacht in 5 % Formalin fixiert. Die sechs gesunden Hautproben stammen von Hautexzidaten aus kosmetischen Eingriffen, die in den Faktoren Geschlecht, Alter und Entnahmestelle übereinstimmten. IHC-Färbungen wurden an Hautproben aus CDLE- Läsionen (n=5) und SCLE- Läsionen (n=5) sowie gesunden Kontrollen (HC; n=5) vorgenommen. Die Patienten wurden über die Bereitstellung und Entnahme ihrer Hautproben aufgeklärt. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis. Alle Untersuchungen wurden gemäß der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) durchgeführt. Diese Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Uni Bonn genehmigt (No. 090/04).

1.2.2 Laser Mikrodissektion und Genexpressionsanalyse

Sowohl die Laser Mikrodissektion und anschließende Genexpressionsanalyse wurde durch Professor Wenzel und Sabine Zahn durchgeführt. Für die Laser Mikrodissektionen wurde ein CX41 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit MMI smart cut system (MMI Molecular Machines, Eching, Germany) benutzt. Nach Fixierung der Proben bei -20°C für 2 Minuten in 75 % Ethanol, erfolgte die Färbung 20 Sekunden lang in 1 % Kresylviolett (in 100 % Ethanol). Daraufhin wurden die Proben für 30 Sekunden in 75 % und 100 % Ethanol gewaschen, 10 min luftgetrocknet und dann bei -80°C gelagert. Aus jeder so kältefixierten Probe wurden dann bis zur Mikrodissektion zehn 8µm dicke Schnitte abgetragen. Im ersten Schritt wurde mit dem Laser die oberen 2/3 der Epidermis abgetragen, im Zweiten dann die Junktionszone. Die Proben eines jeden Patienten wurden dann entsprechend der Exzisionsstelle in Pools (Epidermis, Junktion, Dermis) zusammengeführt. Vier von sechs Proben erreichten pro Pool die nötige Zellzahl von ungefähr 1.000 bis 5.000 Zellen, die eine verlässliche Genexpressionsanalyse gewährleistet. Fünf von sechs junktionalen Proben erfüllten dieses Kriterium. Die dermalen Proben waren alle ausreichend zellreich. Die Proben wurden für die mRNA-Isolierung vorbereitet und amplifiziert (SuperAmp™, Miltenyi, Köln, Deutschland). Die so gewonnene mRNA wurde mit dem PIQOR Immunology Microarray™ (Miltenyi, Köln, Deutschland) analysiert. Die Ergebnisse sind als relative Expressionsrate angegeben (= mRNA CDLE/ mRNA in gesunder Kontrollhaut).

1.2.3 DNA- Stimulation und Genexpressions Assay in HaCaT Zellen

Immortalisierte humane Keratinozyten (HaCaT) (CLS cell Lines Service GmbH Eppelheim, Deutschland) wurden in einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ / well in Corning Costar 24-well Platten (Product-No.: CLS3527, Sigma- Aldrich) und über Nacht bei 37°C in 10 % Fetalem Kalbsserum (FCS) haltigem Dulbecco's modifizierten Eagle Mediums (DMEM) (ohne Antibiotika) inkubiert (Ref.: 41965-039, Gibco, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). Zellen wurden mit der doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure poly (dA:dT) (Invivogen, San Diego, USA) für 24h in 1 % FCS DMEM (ohne Antibiotika) inkubiert. Zur Transfektion wurde Lipofectamin 2000 (REF 11668019; Life Technologies, Carlsbad, USA) eingesetzt. Die Ribonukleinsäure (RNA) aus den stimulierten HaCaT Zellen wurde mittels Nucleospin RNA Kit von Macherey & Nagel [REF 740955, LOT 1704/001; Düren, Deutschland] nach Angaben des Herstellers gewonnen und mittels

Qubit vermehrt. Mittels des QuantSeq 3'-mRNA Library Prep Kit von Lexogen wurde eine Illumina kompatible Bibliothek erstellt. Die RNA wurde sequenziert mit dem Illumina HiSeq 2500 Sequenziersystem mit 10×10^6 reads/Probe und 50 Basenpaare/read im Rapid mode. Die Erstellung der mRNA Library und die Einspeisung der von mir extrahierten RNA aus den von mir gezüchteten und transfizierten Zellen wurde durch das Team der NGS Core Facility (Uniklinikum Bonn) durchgeführt.

1.2.4 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie (IHC) wurden Schnitte aus Formalin-fixierten Paraffin- eingebetteten Gewebsstanzen aus CDLE (n=5), subakut kutanem Lupus erythematodes (SCLE; n=5) und gesunden Kontrollen (HC; n=5) angefertigt. Zur Diagnose der Pathologie wurde eine H&E Färbung durchgeführt. Die spezifischen Antikörper für NKG2D (NBP2-43645, 1:500 pH9, Novus Biologicals) und MICB (14325-1-AP, 1:200, proteintech) wurden mit dem LSAB2™ staining kit (DAKO™) in Kombination mit Fast Red Chromogen angefärbt. Die Färbungen wurden verblindet und unabhängig von Professor Wenzel und mir nach einem etablierten System in Scores evaluiert (Wenzel et al., 2005). Antikörper gegen CD4 (503-3354, 1:20, pH9, Zytomed), CD8 (M7103, 1:50, pH9, Dako Omnis), CD68 (M0876, 1:100, pH9, Dako Omnis) und CD57 (GA647, 1:50, pH9, Dako Omnis) wurden mit Envision FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (GV825, Dako Omnis) und anschließend wie oben beschrieben auf NKG2D gefärbt.

1.2.5 Statistik

Die Genexpressionsanalyse wurde evaluiert mit dem TMEV MultiExperimentViewer 4.9. Genexpressionswerte, die um mehr als das Zweifache im Vergleich zur gesunden Kontrolle hochreguliert waren wurden als signifikant gewertet. Die Signalwege in den Lupus- Hautläsionen wurden mit der „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ (KEGG) Pathway Analyse Software von DAVID Bioinformatic Resources 6.7. erstellt (Huang et al., 2009). Die IHC- Scores wurden mit Hilfe eines non- parametrischen Mann-Whitney U Test (einseitig, $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet) statistisch ausgewertet.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse aus CDLE- Läsionen nach Lasermikrodissektion

Durch die von Prof. Wenzel und Sabine Zahn durchgeführte Auftrennung der CDLE-Läsion in Epidermis, dermoepidermale Junktionszone und Dermis (siehe Figure 1C in Vorwerk et al., 2021) erlangen wir einen differenzierten Einblick in die Pathologie des CLE in den unterschiedlichen Schichten der Haut. Die Grafik 1A in Vorwerk et al., 2021 zeigt die zehn am stärksten exprimierten Gene in den jeweiligen Schichten. Am meisten Aktivität auf Genexpressionsebene liegt in der dermoepidermalen Junktionszone und Dermis vor. Hier findet sich ein Chemokin Muster aus C-X-C Motiv Chemokin 9 (CXCL9) und C-X-C Motiv Chemokin 11 (CXCL11), sowie eine verstärkte Expression von Immunzelloberflächen- Antigenen CD2 und CD68. In diesen Bereichen mit hoher CD2-Expression, also Junktionszone und Dermis, fällt auf, dass das NKG2D- Gen 22,8- bzw. 46,1-mal stärker in aktiv entzündeter CDLE- Haut exprimiert ist als in den gesunden Kontrollhaut- Proben.

1.3.2 Ergebnisse der KEGG- Signalweg- Analyse in CDLE- Läsionen nach Lasermikrodissektion

Um ein besseres Verständnis über die aktivierten Signalwege in CDLE- Hautproben mit hohem NKG2D Expressionsmuster zu gewinnen, habe ich die oben beschriebenen Genexpressionsergebnisse mit der KEGG- Signalweg Datenbank abgeglichen und die hochregulierten Gene den mit diesen assoziierten zellulären Signalwegen zugeordnet (siehe Figure 1B in Vorwerk et al., 2021).

Besonders Gene, die Signalwegen für Zytokine, Immunzellen und Zelltod- Signalwegen zugeordnet werden, erscheinen in CDLE signifikant aktiviert zu sein. Das angeborene Immunsystem ist ebenfalls hochreguliert. Zu erkennen ist dies an den durch Toll-like-, Nukleotid- bindende- Oligomerisations- Domäne- Rezeptor (NOD)-like- und Retinolsäure-induzierbares- Gen- Rezeptor (RIG-I)-like- Rezeptoren gesteuerten und hochregulierten Signalwegen. Zusätzlich spielt die zytosolische DNA- Wahrnehmung eine wichtige Rolle. Die Aktivierung der oben beschriebenen Signalwege scheint ein immunologisches Milieu herbeizuführen, das Killerzellen- gesteuerte Zytotoxizität begünstigt.

1.3.3 In der Haut von SCLE- und CDLE- Patienten sind NKG2D und MICB positive Zellen nachweisbar

Um die starke Expression des NKG2D- Gens in unseren Genexpressionsanalysen zu bestätigen und die mögliche Funktionalität des Genprodukts NKG2D im CLE zu beleuchten, färbte ich Hautproben von an CDLE und SCLE erkrankten Patienten auf NKG2D und den NKG2D- Liganden MICB mittels IHC (siehe Figure 2B in Vorwerk et al., 2021). Entsprechend unserer schichtdifferenzierenden Genexpressionsanalyse ließen sich Zellen des entzündlichen Infiltrats mit NKG2D- Antikörpern anfärben. MICB wird besonders von basalen Keratinozyten im Bereich starker ID exprimiert. Dies zeigt, dass das NKG2D- Gen nicht nur vermehrt transkribiert wird, sondern auch eine tatsächliche Proteinbiosynthese des NKG2D Rezeptors in CLE erfolgt. Der Großteil der NKG2D exprimierenden Zellen im Lupusinfiltrat lässt sich positiv für das CD4 oder CD8 Oberflächenantigen anfärben (siehe Supplementary Figure S4 in Vorwerk et al., 2021).

Die statistische Auswertung identifiziert die Färbung von NKG2D und MICB als signifikant positiv sowohl in CDLE-, als auch in SCLE- Läsionen unter Benutzung eines nonparametrischen Mann- Whitney U Test (*= $p < 0,05$) (siehe Figure 2B in Vorwerk et al., 2021)

1.3.4 Zellstress durch DNA- Transfektion induziert NKG2D- Liganden Expression in HaCaT

Um zu überprüfen, ob Zellstress NKG2D- Liganden in Keratinozyten auslösen kann, wurden HaCaT- Zellen mit poly(dA:dT)- DNA transfiziert, was über zytosolische DNA- Wahrnehmungsrezeptoren eine CLE- typische Immunantwort nachstellt (Scholtissek et al., 2017) MICA-, MICB- und UL16- bindendes- Protein 2 (ULBP2)- Expression werden durch DNA- Transfektion hochreguliert, wobei MICB- und ULBP2- Expression die stärkste Aktivierung erfährt (siehe Figure 2C in Vorwerk et al., 2021).

1.4 Diskussion

Die erhöhte Expression des zytotoxischen NKG2D- Rezeptors im entzündlichen Infiltrat in CLE- Läsionen wurde bisher nicht beschrieben. Ich konnte eine NKG2D- Liganden Expression (ULBP2, MICA, MICB) durch gestresste Keratinozyten nach DNA- Transfektion zeigen, welche einen relevanten Pathomechanismus in CLE darstellt (Scholtissek et al., 2017; Lanier, 2015). So schaffte ich mit meiner Arbeit einen funktionalen Zusammenhang zwischen Pathogenese des Lupus und den zuvor von Prof.

Wenzel gefundenen NKG2D Expressionsergebnissen. Meine histopathologischen Funde beweisen das tatsächliche Vorhandensein von NKG2D in CLE und legen nahe, dass NKG2D- und auch MICB- Expression mit erhöhter zytotoxischer Aktivität gegen Keratinozyten mit Ausbildung der CLE- typischen ID einhergeht. MICB scheint als Signalprotein zu fungieren, da besonders Keratinozyten der Basalschicht MICB exprimieren. Die vermehrte Expression von NKG2D als Rezeptor des angeborenen Immunsystems erfolgt laut unserer KEGG- Analyse in einem CLE- typischen, durch Interferone gesteuerten, zytotoxischen Milieu. Zusätzlich bestätigt meine Analyse die Hypothese, dass die Pathogenese des CLE durch übermäßige Aktivierung angeborener Immunabwehr durch Toll- like Rezeptor- Signalwege, RIG- I like und zytosolische DNA- Wahrnehmung geprägt scheint. Die hier gezeigten Daten stimmen mit unseren früheren Expressionsanalysen in Hautproben aus CDLE und SCLE und mit neueren Funden aus Haarfollikeln aus CDLE- Läsionen überein (Scholtissek et al., 2017; Shalhaf et al., 2019).

Die Verlässlichkeit unseres experimentellen Ansatzes wird dadurch gestützt, dass sie die in IHC- Färbungen von CDLE- Haut typische Verteilung der Expression gut spiegelt. So ist es zum Beispiel plausibel, dass in der Dermis, in der die größeren Gefäße der Haut verlaufen, die transendotheliale Migration der Immunzellen und Epithelzellsignalwege in der Epidermis zu finden sind.

Die Beteiligung von NKG2D und seinen Liganden in CLE passt zu Ergebnissen, die Gene für MICB mit einer Suszeptibilität für CLE und eine NKG2D- Genvariante mit SLE- Manifestation assoziieren (Kabalak et al., 2010; Kunz et al., 2015). Bekanntermaßen spielt NKG2D eine wichtige Rolle in der Immunabwehr gegen körperfremde Pathogene und Viren, die ebenfalls über Aktivierung der zytosolischen RNA- und DNA- Wahrnehmung aktiviert wird, die auch in den hier gezeigten aktivierten Signalwegen im CDLE hochreguliert sind. Interferone unterstützen darüber hinaus eine NKG2D gesteuerte Immunität, denn $IFN\alpha$ scheint die Fähigkeit zu besitzen MICA- und MICB- Expression in dendritischen Zellen zu steigern und so die Zytotoxizität von NK- Zellen zu fördern (Raulet et al., 2013; Jinushi et al., 2003). Eine weitere Verbindung zwischen NKG2D- Aktivität und CLE kann in der Hochregulation von MICB in Keratinozyten nach UVB- Bestrahlung gefunden werden. UV- Sensibilität ist ein zentraler Aspekt der Klinik und Exazerbation des CLE (Vantourout et al., 2014).

Um die pathomechanische Rolle von NKG2D in CLE weiter zu beleuchten, bedarf es in Zukunft weiterer Untersuchungen. Autoreaktive NKG2D⁺CD8⁺ T- Zellen scheinen zum Beispiel auch in der Pathogenese der Alopecia areata, einer anderen IFN- gesteuerten Autoimmunerkrankung, die ebenfalls durch Zytotoxizität gegen Keratinozyten charakterisiert ist, eine zentrale Rolle zu spielen. Hier kommt es ebenfalls zur Expression von MICA in entzündeten Haarfollikeln (Gilhar et al., 2019). Durch meine Doppelfärbungen mit CD4 und CD8 zeigt sich das CD4- und CD8- positive Zellen den größten Anteil des NKG2D⁺ Infiltrats in CLE ausmacht. In Zukunft sind weitere Experimente zur genauen Charakterisierung dieser Zellpopulationen und Untersuchungen zum genauen Einfluss der NKG2D- Rezeptoraktivität auf die Zytotoxizität dieser Zellen in CLE nötig.

1.5 Zusammenfassung

Durch meine Arbeit wurde zum ersten Mal eine Beteiligung des zytotoxischen NKG2D- Rezeptors und seiner Liganden in CLE beschrieben und bereits erste mögliche funktionelle Zusammenhänge herausgearbeitet. Hierfür nutzte ich die KEGG- Analyse zur Charakterisierung der immunologischen Aktivität in CLE- Läsionen mit starker NKG2D- Expression, IHC zum Nachweis des Rezeptors und seiner Liganden in CLE und den Nachweis der Expression dieser Liganden in CLE- typisch gestressten Keratinozyten in vitro. Die Beteiligung des zytotoxischen NKG2D- Rezeptors an der Pathogenese des CLE erscheint plausibel. Er ist Teil des angeborenen Immunsystems, welches im CLE übermäßig aktiviert ist. Diese Aktivierung spiegelt sich auch in meinen Auswertungen der Expressionsdaten aus CDLE- Läsionen nach Lasermikrodissektion wider.

1.6 Literaturverzeichnis

Ehrlich LI, Ogasawara K, Hamerman JA, Takaki R, Zingoni A, Allison JP, Lanier LL. Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2005; 174: 1922–1931

Gilhar A, Laufer-Britva R, Keren A, Paus R. Frontiers in alopecia areata pathobiology research. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2019; 144: 1478–1489

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 2009; 4: 44–57

Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation. *J Immunol* 2003; 170: 1249–1256

Kabalak G, Thomas RM, Martin J, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, Ramón E de, Buyny S, Hamsen S, Gross WL, Schnarr S, Zeidler H, Gromnica-Ihle E, Schmidt RE, Witte T. Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations. *Human immunology* 2010; 71: 74–78

Kuhn A, Wenzel J, Bijl M. Lupus erythematosus revisited. *Seminars in immunopathology* 2016; 38: 97–112

Kunz M, König IR, Schillert A, Kruppa J, Ziegler A, Grallert H, Müller-Nurasyid M, Lieb W, Franke A, Ranki A, Panelius J, Koskenmies S, Hasan T, Kere J, Rönn A-CC, Simon JC, Schmidt E, Wenzel J, Tüting T, Landsberg J, Zeller T, Blankenberg S, Gläser R, Patsinakidis N, Kuhn A, Ibrahim SM. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for cutaneous lupus erythematosus. *Exp. Dermatol.* 2015; 24: 510–515

Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 575–582

Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE, Borrego F. NKG2D Is a Costimulatory Receptor for Human Naive CD8+ T Cells. *J Immunol* 2005; 174: 4480–4484

Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31: 413–441

Sarkar MK, Hile GA, Tsoi LC, Xing X, Liu J, Liang Y, Berthier CC, Swindell WR, Patrick MT, Shao S, Tsou P-S, Uppala R, Beamer MA, Srivastava A, Bielas SL, Harms PW, Getsios S, Elder JT, Voorhees JJ, Gudjonsson JE, Kahlenberg JM. Photosensitivity and type I IFN responses in cutaneous lupus are driven by epidermal-derived interferon kappa. *Annals of the rheumatic diseases* 2018; 77: 1653–1664

Scholtissek B, Zahn S, Maier J, Klaeschen S, Braegelmann C, Hoelzel M, Bieber T, Barchet W, Wenzel J. Immunostimulatory Endogenous Nucleic Acids Drive the Lesional Inflammation in Cutaneous Lupus Erythematosus. *The Journal of investigative dermatology* 2017; 137: 1484–1492

Shalhaf M, Alase AA, Berekmeri A, Md Yusof MY, Pistolic J, Goodfield MJ, Edward S, Botchkareva NV, Stacey M, Vital EM, Wittmann M. Plucked hair follicles from patients with chronic discoid lupus erythematosus show a disease-specific molecular signature. *Lupus Sci Med* 2019; 6: e000328

Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Freitas JP, Marques Gomes M, Filipe P. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Autoimmune diseases* 2012; 2012: 834291

Vantourout P, Willcox C, Turner A, Swanson CM, Haque Y, Sobolev O, Grigoriadis A, Tutt A, Hayday A. Immunological visibility. *Science translational medicine* 2014; 6: 231ra49

Vorwerk G, Zahn S, Bieber T, Wenzel J. NKG2D and its ligands as cytotoxic factors in cutaneous lupus erythematosus. *Experimental Dermatology* 2021, 30(6): 847-852

Wenzel J, Tüting T. An IFN-associated cytotoxic cellular immune response against viral, self-, or tumor antigens is a common pathogenetic feature in “interface dermatitis”. *The Journal of investigative dermatology* 2008; 128: 2392–2402

Wenzel J, Wörenkämper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T, Tüting T. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *The Journal of pathology* 2005; 205: 435–442

Werth VP. Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews* 2005; 4: 296–302

Zahn S, Rehkämper C, Kümmerer BM, Ferring-Schmidt S, Bieber T, Tüting T, Wenzel J. Evidence for a pathophysiological role of keratinocyte-derived type III interferon (IFN λ) in cutaneous lupus erythematosus. *The Journal of investigative dermatology* 2011; 131: 133–140

2. Veröffentlichung



Received: 6 June 2020 | Revised: 9 January 2021 | Accepted: 15 February 2021

DOI: 10.1111/exd.14311

CONCISE COMMUNICATION

Experimental Dermatology WILEY

NKG2D and its ligands as cytotoxic factors in cutaneous lupus erythematosus

Gero Vorwerk | Sabine Zahn | Thomas Bieber | Joerg Wenzel

Department of Dermatology and Allergy,
University of Bonn, Bonn, Germany

Correspondence

Joerg Wenzel, Department of
Dermatology and Allergy, University of
Bonn, Venusberg-Campus 1, Bonn 53127,
Germany.
Email: joerg.wenzel@ukbonn.de

Abstract

Cutaneous lupus erythematosus (CLE) is an autoimmune skin disorder that is characterized by an anti-epidermal lymphocytic infiltrate invading the dermo-epidermal junction, causing an interface dermatitis (ID). Pathogenesis of CLE has been linked to activation of innate immunity. NKG2D is an innate immune receptor on NK cells and distinct T-cell populations. The NKG2D ligands MHC class I polypeptide-related sequence A and B (MICA, MICB) have been associated to CLE susceptibility. Our gene microarray analyses of chronic discoid lupus erythematosus (CDLE) skin lesions, separated in epidermal, junctional and dermal skin areas via laser microdissection, revealed a high expression of NKG2D in the lymphocytic infiltrate and led us to further investigate the role of NKG2D in CLE. Pathway analyses showed a strong “interferon (IFN) signature” and vast activation of innate immune response pathways (TLR, RIG-I, cytosolic DNA sensing, JAK/STAT) in CDLE, that expressed the high NKG2D signal. Immunohistochemistry (IHC) confirmed the presence of NKG2D and its ligand MICB in CDLE and subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE) lesions. Finally, HaCaT cells were stimulated with nucleic acids and extracted RNA was sequenced with Illumina HiSeq and showed that stressed keratinocytes express typical NKG2D ligands MICA/B and ULBP2. This study provides first evidence that NKG2D is present in CDLE and SCLE skin lesions and could be relevant for cytotoxicity in IFN-driven skin lesions with upregulated innate immune response pathways present in CLE. It could furthermore play a role in CLE inflammation promoted by keratinocytes under cell stress.

KEYWORDS

cell stress, innate immunity, interferon, MICB, skin

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2021 The Authors. *Experimental Dermatology* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | BACKGROUND

Cutaneous lupus erythematosus (CLE) is a complex autoimmune disease of the skin characterized by erythematous-squamous lesions. The formation of CLE has proven to be closely linked to the activation of molecular pathways associated with innate immunity, especially triggered by the presence and response to cytosolic pattern recognition receptor (PRR)-ligands in keratinocytes.¹ Histologically, CLE presents with a cytotoxic interface dermatitis (ID) regulated by interferon (IFN)-associated proinflammatory cytokines.² This cytotoxicity against keratinocytes is strongly implicated through the presence of cytotoxic markers like TRAIL and FasL in CLE lesions.^{3,4} Recently, yet another cytotoxic marker has been associated to CLE formation. The MICA and MICB genes, coding for ligands to the cytotoxic NKG2D receptor, have been identified as susceptibility loci for CLE through genome-wide association studies.⁵ NKG2D, a type II integral protein with an extracellular C-type lectin domain, is an innate immunity receptor expressed on all human NK cells, CD8⁺ $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cells and CD8⁺ $\gamma\delta$ -TCR⁺ T cells, supporting cytotoxicity in NK cells and serving as a costimulator of proliferation and immunity in T cells.^{6,7} When analysing gene expression of lymphocytic infiltrate

in chronic discoid lupus erythematosus (CDLE), we found NKG2D expression to be upregulated. This led us to further investigate its possible contribution to CLE lesion formation.

1.1 | Questions addressed

Aim of this study was to investigate the role of NKG2D and its ligands as cytotoxic factors in CLE skin lesions.

2 | EXPERIMENTAL DESIGN

2.1 | Patients and healthy donors

For gene expression analysis, two 4 mm lesional punch skin biopsies taken from 6 patients with active CDLE were investigated. One biopsy was flash frozen in liquid nitrogen, and the other one was fixed in 5% formalin overnight. Healthy control biopsies (HC) were taken from unaffected cosmetic surgery skin samples of six sex, age and skin-site matched patients. For IHC, sections from CDLE ($n = 5$) and

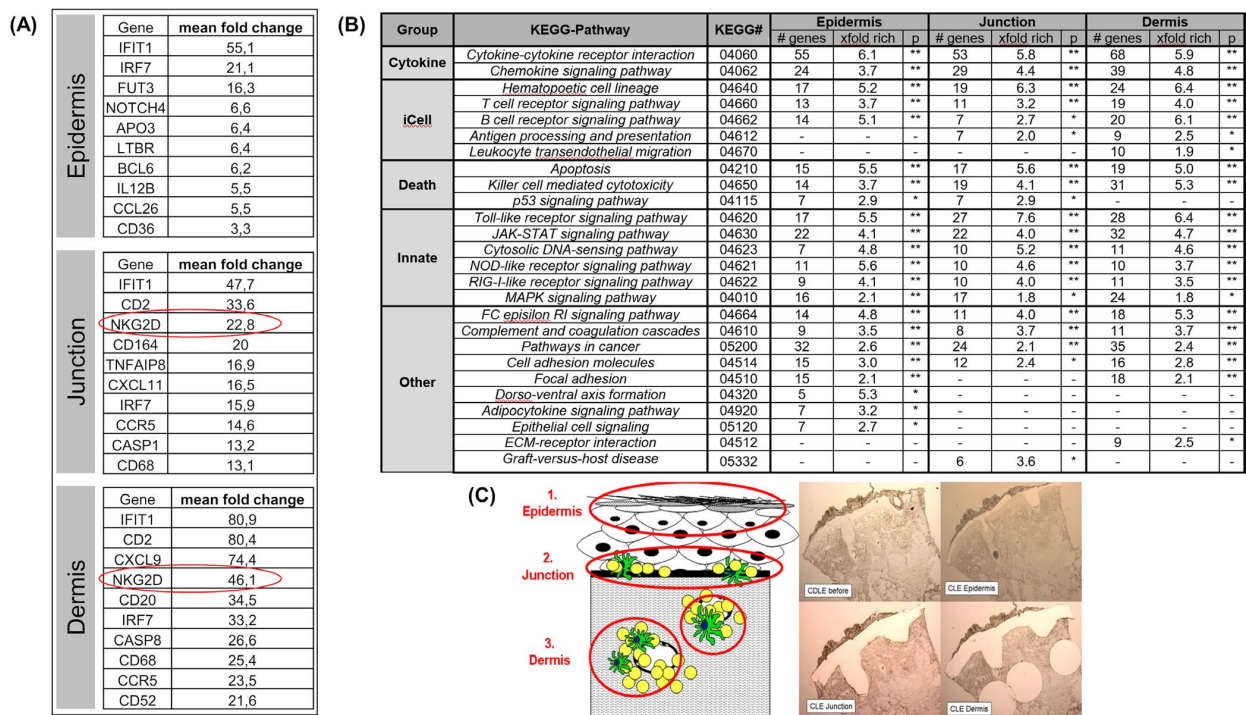


FIGURE 1 NKG2D is the most upregulated cytotoxic marker in Junction and Dermis of CDLE skin biopsies with a high activity of innate immunity pathways. (A) The ten most upregulated genes by mean fold change in epidermis, junction and dermis of CDLE are shown. (B) All genes, which were significantly expressed in diseased skin (\geq fold when compared with healthy controls), were clustered following the KEGG classification, to identify activated pathways within CDLE lesions. Given is the absolute number of genes (#genes) which were identified in each pathway and the relative enrichment rate (xfold rich) relative to the statistically expected number. Significances were determined using the fisher exact test (**= $p > 0.01$, *= $p < 0.05$). (C) illustrates the laser microdissection procedure in a schematic diagram and shows histological micrographs taken after each step of the microdissection. In each step, one part (epidermis, junction, dermis) of the 8 μ m cryofixed skin slices was removed, collected and later processed for mRNA isolation

SCLE ($n = 5$) and healthy controls (HC; $n = 5$) were taken. All patients included had signed an informed consent before excision. The study was performed in accordance with the Helsinki declaration after approval by the local ethic committee (BN 09004).

2.2 | Laser microdissection and gene expression analyses

Biopsies were cut into 8 μm slices, dissected with a laser into epidermis, junction and dermis (Figure 1C). Samples were pooled, and RNA was isolated and prepared for gene microarray analysis. Results are given in relative expression rates (= mRNA rate CDLE / mRNA rate healthy skin) as shown before (For details see Appendix S1).⁴

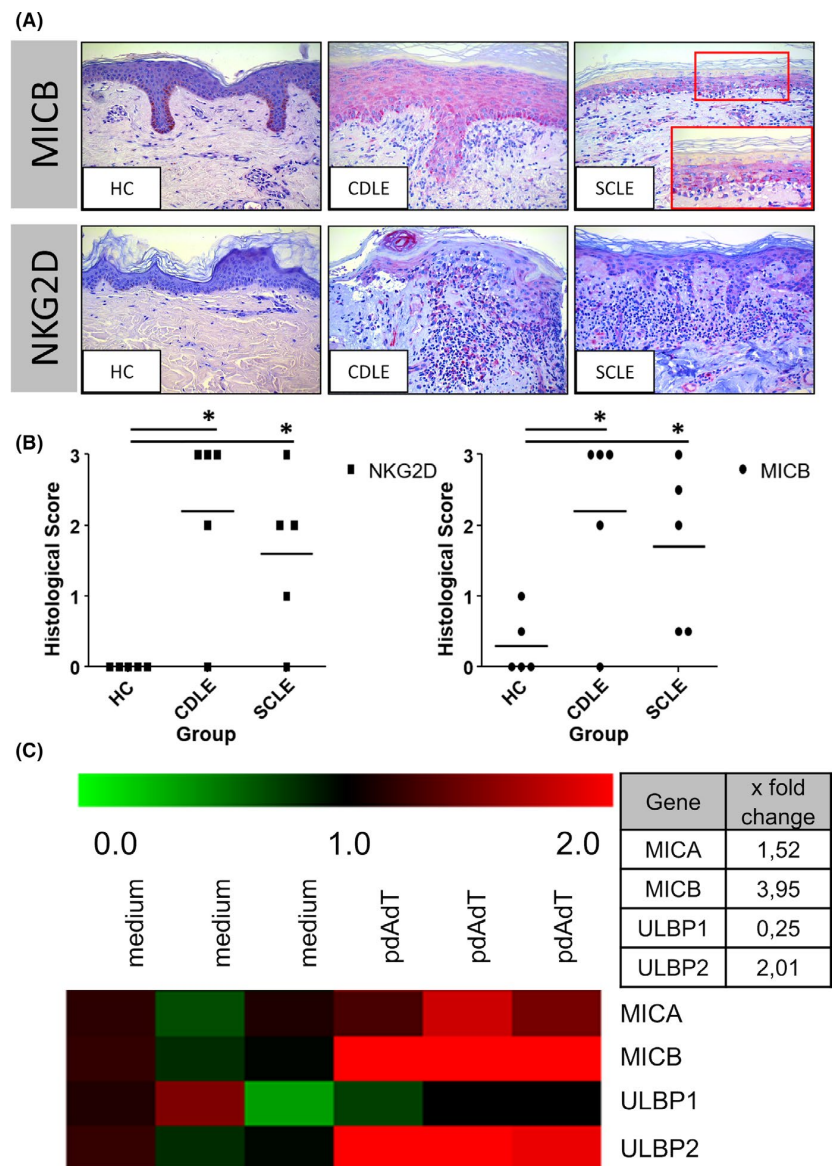
2.3 | DNA-stimulation and gene expression assay in HaCaT cells

HaCaT cells were transfected with poly[dA:dT] for 24 h. RNA was extracted and prepared for gene expression analysis via Illumina HiSeq 2500 as shown before (For details see Appendix S2).⁸

2.4 | Immunohistochemistry

Lesions were prepared from formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsies and stained for MICB and NKG2D through IHC as shown before (For details see Appendix S3).⁹

FIGURE 2 MICB can be found in keratinocytes and NKG2D in the infiltrate of CDLE and SCLE. Expression of MICA, MICB and ULBP2 is upregulated in HaCaTs after transfection of DNA. (A) IHC staining of MICB and NKG2D in lesions of CDLE, SCLE and in Healthy Controls (HC). Original magnification 200x; red highlight: 400x magnification close up of ID in MICB positive SCLE (B) Semi-quantitative histological score of NK2D and MICB in CDLE and SCLE, bars indicate the mean; Significances were determined using a non-parametric Mann-Whitney U test ($* = p < 0.05$). (C) Heatmap +x fold change in upregulated genes encoding NKG2D target proteins (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2) in stressed HaCaT cells after transfection of poly[dA:dT] (pdAdT) and medium controls (medium) after 24 h (normalized to mean expression of medium controls)



2.5 | Statistical procedures

Gene expression analyses were evaluated using the TMEV MultiExperimentViewer 4.9. A more than twofold upregulated gene expression in comparison with healthy skin was scored as significant in CDLE. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses were performed by DAVID Bioinformatics Resources 6.7.¹⁰ IHC scores were evaluated using a non-parametric Mann-Whitney U test (one tailed; $p < 0.05$ are considered significant).

3 | RESULTS

3.1 | Top 10 upregulated genes show cytotoxicity through NKG2D and an IFN-driven expression pattern

When looking at the gene expression analysis, it is evident that changes in gene expression in dermis and junction is dominated by the CD2⁺ lymphocytic infiltrate associated with a high expression of the cytotoxic receptor NKG2D. One can further make out a high activity of IFN-driven immunity in the whole CDLE lesion, since epidermis, dermis and junctional zone show high expression levels of IFIT1 and IRF7. Additionally, the IFN-regulated chemokines CXCL11 in the junctional zone and CXCL9 in the dermis can be found under the ten most upregulated genes (Figure 1A).

3.2 | "KEGG analyses" demonstrate activation of innate immune response pathways in CDLE

To better characterize the immunological environment, in which NKG2D is upregulated we clustered all significantly (\geq twofold higher in CDLE than in controls) expressed genes following the KEGG classification to identify the activated pathways in CDLE. Genes that belong to cytokine, immune cell and cell death pathways were significantly activated in CDLE skin lesions (Figure 1B). Importantly, these analyses also indicated a strong activation of the most important innate immune response pathways Toll-like receptor, JAK-STAT, MAPK, NOD-like, RIG-I-like and cytosolic DNA sensing. All of these amongst other things seem to lead to a significant activation of pathways associated with killer cell mediated cytotoxicity (Figure 1B). The reliability of our approach was supported by the fact, that the pathways identified in different skin areas (epidermis, junction, dermis) perfectly reflected the typical histological and IHC findings in CDLE. For example, genes which belong to leukocyte transendothelial migration were specifically enriched in dermal areas, while genes which belong to epithelial cell signalling, were mainly found within the epidermis.

3.3 | CDLE and SCLE stain positive for NKG2D and MICB in IHC

IHC staining reveals a NKG2D⁺ infiltrate of the dermo-epidermal junction and perivascular in the dermis of both CDLE and SCLE (Figure 2A). High expression of NKG2D in the infiltrate seems to correlate with formation of a strong ID in the adjacent basal epidermal layer. IHC staining of MICB in CDLE and SCLE shows that especially keratinocytes of the basal layer present positive for MICB (highlighted in Figure 2A). The staining in CDLE, as well as SCLE for both NKG2D and MICB, scored significantly high (non-parametric Mann-Whitney U test ($*= p < 0.05$)) (Figure 2B). The majority of NKG2D⁺ cells in CDLE appear CD4⁺ or CD8⁺ in IHC double staining experiments (for details see Figure S4).

3.4 | HaCaTs express ligands of NKG2D under stress

We looked for targets of NKG2D in immortalized HaCaT keratinocytes under stress through transfection of poly[dA:dT]-DNA fragments, which as activators of cytosolic PRRs trigger a CLE-typical immune response in keratinocytes.¹ The expression of typical NKG2D target proteins MICA, MICB and ULBP2¹¹ are upregulated. MICB and ULBP2 were the most prominently upregulated, whereas ULBP1 is not upregulated in stressed keratinocytes (Figure 2C).

4 | CONCLUSIONS

Our approach of laser microdissection before gene expression led to a more refined view of the expression pattern exhibited by the single entities driving the CDLE lesion, epidermal keratinocytes and infiltrating cells in both junction and dermis.

The expression of the innate immune receptor NKG2D in the CDLE infiltrate in both junctional zone and dermis has not been documented before. We were furthermore able to show an upregulation of the NKG2D ligands MICA, MICB and ULBP2, which plays a role in cell stress response,¹¹ in keratinocytes after DNA transfection. Both NKG2D and MICB proved to be present in active CDLE lesions. The expression of NKG2D and MICB can predominantly be seen adjoined to ID, a typical histological finding in CLE caused by IFN-driven cytotoxicity.^{2,12} Moreover, we provide further evidence that the overexpression of IFN-regulated genes in the skin is probably due to an inappropriate lesional activation of innate immune response mechanisms, including not only TLR-dependent (TLR) but also TLR-independent innate immune pathways (Cytosolic DNA sensing, RIG-I-like) in epidermis, junction and dermis. These pathways lead to the expression of type I IFNs and IFN-regulated chemokines, which orchestrate an adaptive immune response and drive the recruitment of cytotoxic effector cells,¹³ a hallmark of CDLE. These findings are consistent with our former analyses of gene expression patterns in punch biopsies of CDLE and

SCLE¹ and are similar to recent findings of expression patterns in plucked hair follicles of CDLE patients.¹⁴ Next to the findings of the MICB gene being a susceptibility locus for CLE,⁵ and NKG2D appears to be a reasonable effector in CLE lesion inflammation, with a NKG2D gene variant linked to systemic lupus erythematosus (SLE) manifestation,¹⁵ and a study by Yoshida et al. showing a significant correlation of skin involvement in SLE patients and mutations of MICA in a Japanese population.¹⁶ The established role of NKG2D in defence against pathogens and viruses, also linked to cytosolic RNA- (via RIG-I and MDA-5) and cytosolic DNA sensing¹⁷ fits our recent understanding of CLE pathogenesis and the analysis of molecular pathway activation in CDLE at hand. Although we acknowledge the diverse mechanism of NKG2D dependent activation and costimulation of CD8⁺ T cells and its more selective role in autoimmunity, which to date is not fully understood and discussed,^{6,18} one can find promising factors supporting a NKG2D activity in CLE. The IFN-driven immunity in CLE² could benefit NKG2D modulation of inflammation. Jinushi et al. noted an upregulation of MICA/B in DCs, when stimulated with IFN α , and a resulting capacity to activate cytotoxicity in NK cells.¹⁹ In addition UVB irradiation, a major exacerbating factor of CLE, induces MICA upregulation in HaCaTs and MICA/B and ULBP2 upregulation in primary keratinocytes.²⁰ In conclusion, our findings suggest a plausible role of NKG2D driven immunity in an immunological environment found in CDLE. To further understand, the relevance of NKG2D modulated immunity in CLE and to harness its power therapeutically more systemic studies must be conducted to further characterize the NKG2D⁺ cell populations and its effect on cytotoxicity of these cells.

CONFLICT OF INTEREST

The authors are not aware of any conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GV and JW designed the research study. GV, SZ and JW performed the research and analysed the data. GV, SZ, TB and JW interpreted the data, drafted the manuscript and approved the submitted version.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, JW, upon reasonable request.

ORCID

Joerg Wenzel  <https://orcid.org/0000-0002-4744-5993>

REFERENCES

- Scholtissek B, Zahn S, Maier J, et al. Immunostimulatory endogenous nucleic acids drive the lesional inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol.* 2017;137(7):1484-1492. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.03.01>
- Wenzel J, Tüting T. An IFN-associated cytotoxic cellular immune response against viral, self-, or tumor antigens is a common pathogenetic feature in "interface dermatitis". *J Invest Dermatol.* 2008;128(10):2392-2402. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.96>
- Mande P, Zirak B, Ko W-C, et al. Fas ligand promotes an inducible TLR-dependent model of cutaneous lupus-like inflammation. *J Clin Invest.* 2018;128(7):2966-2978. <https://doi.org/10.1172/JCI98219>
- Zahn S, Rehkämper C, Ferring-Schmitt S, Bieber T, Tüting T, Wenzel J. Interferon- α stimulates TRAIL expression in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells: Implications for the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol.* 2011;165(5):1118-1123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10479.x>
- Kunz M, König IR, Schillert A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for cutaneous lupus erythematosus. *Exp Dermatol.* 2015;24(7):510-515. <https://doi.org/10.1111/exd.12708>
- Ehrlich LI, Ogasawara K, Hamerman JA, et al. Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 2005;174(4):1922-1931.
- Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE, Borrego F. Cutting edge: NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 2005;174(8):4480-4484. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4480>
- Wenzel J, Landmann A, Vorwerk G, Kuhn A. High expression of B lymphocyte stimulator in lesional keratinocytes of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Exp Dermatol.* 2018;27(1):95-97. <https://doi.org/10.1111/exd.13419>
- Wenzel J, Wörenkämper E, Freutel S, et al. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol.* 2005;205(4):435-442. <https://doi.org/10.1002/path.1721>
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Lanier LL. NKG2D receptor and its ligands in host defense. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(6):575-582. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0098>
- Wenzel J, Tüting T. Identification of type I interferon-associated inflammation in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus opens up options for novel therapeutic approaches. *Exp Dermatol.* 2007;16(5):454-463. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00556.x>
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>
- Shalhaf M, Alase AA, Berekmeri A, et al. Plucked hair follicles from patients with chronic discoid lupus erythematosus show a disease-specific molecular signature. *Lupus Sci Med.* 2019;6(1):e000328. <https://doi.org/10.1136/lupus-2019-000328>
- Kabalak G, Thomas RM, Martin J, et al. Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations. *Hum Immunol.* 2010;71(1):74-78. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.09.352>
- Yoshida K, Komai K, Shiozawa K, et al. Role of the MICA polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011;63(10):3058-3066. <https://doi.org/10.1002/art.30501>
- Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol.* 2013;31(1):413-441. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095951>
- Guerra N, Pestal K, Juarez T, et al. A selective role of NKG2D in inflammatory and autoimmune diseases. *Clin Immunol.* 2013;149(3):432-439. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.09.003>
- Jinushi M, Takehara T, Kanto T, et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2003;170(3):1249-1256. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1249>

20. Vantourout P, Willcox C, Turner A, et al. Immunological visibility: Posttranscriptional regulation of human NKG2D ligands by the EGF receptor pathway. *Sci Transl Med*. 2014;6(231):231ra49. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007579>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

APPENDIX S1. Preparation of skin slices for laser microdissection and consecutive gene expression analysis – detailed protocol.

APPENDIX S2. DNA-stimulation and gene-expression assay in HaCaT cells – detailed protocol.

FIGURE S1. CD4⁺ and CD8⁺ T cells form the majority of the NKG2D⁺ positive infiltrate in CDLE.

How to cite this article: Vorwerk G, Zahn S, Bieber T, Wenzel J. NKG2D and its ligands as cytotoxic factors in cutaneous lupus erythematosus. *Exp Dermatol*. 2021;30:847–852. <https://doi.org/10.1111/exd.14311>

NKG2D and its ligands as cytotoxic factors in Cutaneous Lupus Erythematosus

APPENDIX

Supplement- S1: Preparation of skin slices for laser microdissection and consecutive gene expression analysis – detailed protocol

The MMI smart cut system (MMI Molecular Machines, Eching, Germany) with the CX41 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) was used for laser microdissection (Figure 1 C). Ten 8µm slices taken from cryofixed material were prepared from each probe. Slices were cut on a cryostat and air dried for 1 minute. The samples were incubated for 2 minutes in 75% ethanol at -20°C, stained for 20 seconds in 1% cresyl violet in 100% ethanol, washed in 75% and 100% ethanol for 30 seconds, air dried for 10min and stored at -80°C until laser microdissection dissection. In the first step the upper 2/3 of the epidermis were removed by the laser, in the second step the junctional zone was excised (see Figure 1). All these dissections were performed by the same person (JW). The dissected material of the corresponding layers (epidermis, junction, dermis) of each patient sample was pooled. For reliable gene expression analyses we needed pools of roughly 1,000 to 5,000 cells. This number was reached in four out of six of the epidermal samples and in five out of six of the junctional samples. These were processed for mRNA isolation and amplification (SuperAmp™, Miltenyi, Cologne, Germany) and then analysed using the PIQOR Immunology Microarray™ (Miltenyi, Cologne, Germany). Results are given in relative expression rates (= mRNA rate CDLE / mRNA rate healthy skin).

Supplement- S2: DNA-stimulation and gene-expression assay in HaCaT cells – detailed protocol

HaCaT-cells were seeded out at a density of $1,5 \times 10^6$ / well in Corning Costar 24-well plates (Product-No.: CLS3527, Sigma-Aldrich) and incubated overnight at 37°C in 10% FCS DMEM (no antibiotics) [Ref.: 41965-039, Gibco, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA]. Stimulation was achieved by incubating the cells with poly[dA:dT] (Invivogen, San Diego, USA). Lipofectamine 2000 (REF 11668019; Life Technologies, Carlsbad, USA) was used as a transfection agent. For the Stimulation cells were incubated for 24h in 1% FCS DMEM (no antibiotics). RNA from stimulated HaCaTs was isolated with the Nucleospin RNA Kit by Macherey & Nagel [REF 740955, LOT 1704/001; Düren, Germany] according to the manufacturer's instructions. RNA was amplified using Qubit. The library was prepared with the QuantSeq 3'-mRNA Library Prep kit by Lexogen. RNA was sequenced using an Illumina HiSeq 2500 sequencing system generating 10×10^6 reads/sample with 50 bp/read in Rapid mode.

Supplement- S3: Immunohistochemistry of NKG2D and MICB in CDLE and SCLE

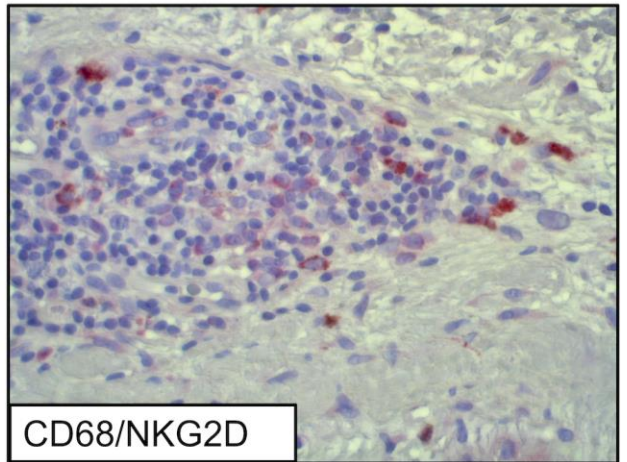
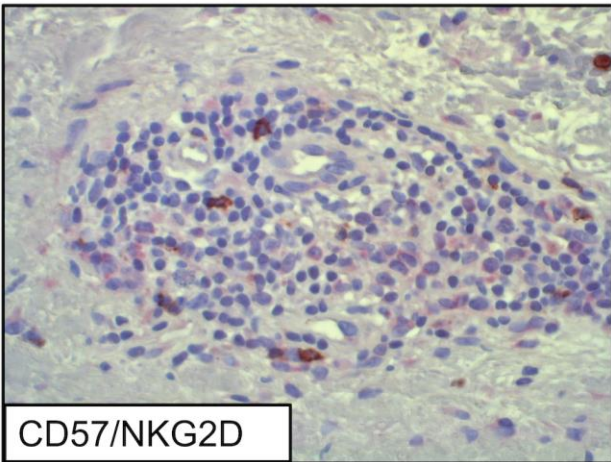
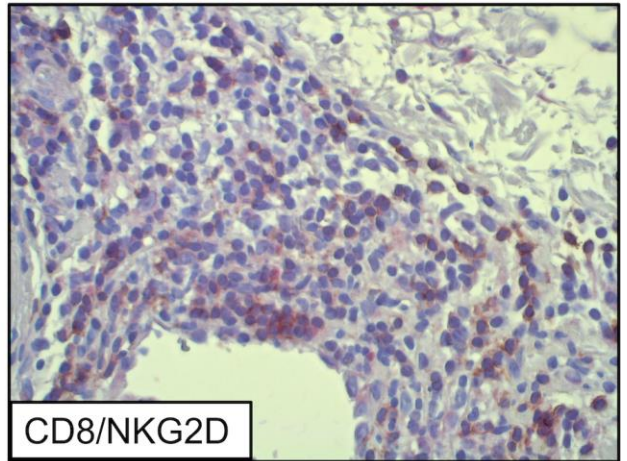
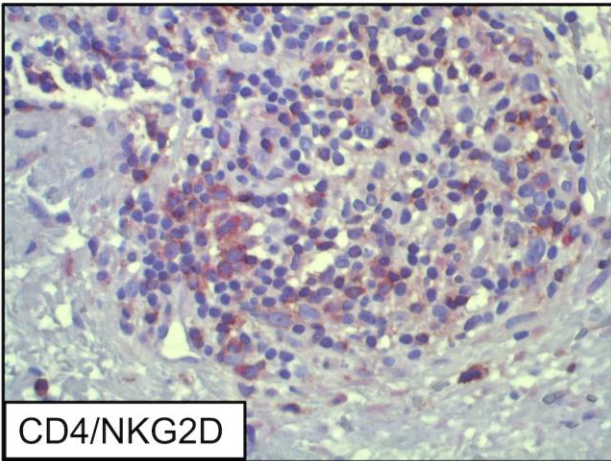
Sections from CDLE (n=5) and subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE; n=5) and healthy controls (HC; n=5) lesions were prepared from formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsies. Standard H&E and periodic acid-Schiff staining was performed for diagnostic purposes. Visualisation was performed using the LSAB2™ staining kit (DAKO™) with Fast Red Chromogen and antibodies targeting NKG2D (NBP2-43645 ,1:500 pH9, Novus Biologicals) and MICB (14325-1-AP, 1:200, proteintech). Results were independently evaluated on blinded specimens by two of the authors (JW and GV) as described before. For IHC double staining antibodies targeting CD4 (503-3354, 1:20, pH9, Zytomed), CD8 (M7103, 1:50, pH9, Dako Omnis), CD68 (M0876, 1:100, pH9, Dako Omnis) and CD57 (GA647, 1:50, pH9, Dako Omnis)

were stained using the Envision FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (GV825, Dako Omnis) prior to visualisation of NKG2D as described above.

FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure- S4: CD4⁺ and CD8⁺ T cells form the majority of the NKG2D⁺ positive infiltrate in CDLE

IHC double staining of CD4, CD8, CD57 and CD68 (brown) with NKG2D (red) in CDLE shown at 400x magnification.



3. Danksagung

Mein Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jörg Wenzel, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für die außerordentliche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Experimente und der Auswertung der Ergebnisse. Ich möchte mich bei ihm für die ausgezeichnete Betreuung und seine motivierenden Worte in Krisenzeiten bedanken. Ein großer Dank geht an das Team der Histologie in der Dermatologie für ihre fachmännische und emotionale Unterstützung. Mein Dank gilt auch Frau Zahn für ihre Beratung im Zuge der Publikation. Meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und Ermutigung.