Genetische und zelluläre Analyse der Pathogenese des psoriasiformen Phänotyps im CD18 hypomorphen Mausmodell

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Daniel Keß

aus Bad Kissingen

Ulm

2004

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Roswitha Nischt

Prof. Dr. Jens Brüning

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2004

Meinen Eltern

und Anja

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Aufbau der Haut 1
1.2. Psoriasis vulgaris oder Schuppenflechte 1
1.2.1. Pathogenese der Psoriasis vulgaris 3
1.2.1.1. T-Zellen 3
1.2.1.2. Schema einer T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion 4
1.2.1.3. Psoriasis vulgaris als Autoimmunerkrankung 5
1.2.2. Blockierung der T-Zellfunktion als Behandlungsstrategie der Psoriasis vulgaris 5
1.3. Auswanderung entzündlicher Zellen 6
1.4. β_2-Integrine 7
1.5. Rolle von β_2-Integrinen bei der Psoriasis vulgaris des Menschen 7
1.6. CD18-defiziente Mausmodelle 8
1.6.1. Fehlen von CD18 beim Menschen und bei der Maus 9
1.6.2. CD18 hypomorphes Mausmodell 10
1.6.2.1. Generierung der CD18 hypomorphen Mutation 10
1.6.2.2. Psoriasiforme Dermatitis bei CD18 hypomorphen PL/J-Mäusen 11
1.6.2.3. Die psoriasiforme Dermatitis als Modell einer polygenen Erkrankung 12
1.7. Genetische Analyse polygener Erkrankungen 13
1.7.1. Psoriasis als polygene Erkrankung 13
1.7.2. Untersuchung polygener Erkrankungen im Mausmodell 14
1.7.3. Rückkreuzung von Mäusen 15
1.7.4. Kopplungsanalysen 15
1.8. Zielsetzung 18

2. Material und Methoden 19

2.1. Material 19
2.1.1. Geräte 19
2.1.2. Verbrauchsmaterial 20
2.1.3. Chemikalien, Seren und Medien 20
2.1.4. Puffer 22
2.1.5. Antikörper 23
2.1.6. Enzyme 23
2.1.7. Nukleotide 24
2.1.8. Materialien für die Mikrosatellitenanalyse 24
2.2. Methoden 25
2.2.1. Mäuse 25
2.2.1.1. Mäuse mit unterschiedlichen Mutationen 25
2.2.1.2. Mauszucht 25
2.2.1.2.1. Allgemeines 25
2.2.1.2.2. Rückkreuzung zwischen CD18^{hypo} PL/J- und C57BL/6J-Mäusen 26
2.2.1.3. Beurteilung des Phänotyps von CD18^{hypo} Mäusen 26
2.2.1.3.1. Phänotypisierung der Nachkommen aus der Rückkreuzung 26
2.2.1.3.2. Erweiterter adaptierter PASI-Score zur Beurteilung von Therapieerfolgen 27
2.2.2. Genotypisierung der Mäuse 27
2.2.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien (Proteinase K-Verdau) 27

2.2.2.2. Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) 28
2.2.2.2.1. Restriktionsspaltung 28
2.2.2.2.2. Gelelektrophorese 29
2.2.2.2.3. Transfer von DNA auf Nitrozellulose 29
2.2.2.2.4. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden 29
2.2.2.2.5. Hybridisierung mit DNA-Sonden 30
2.2.2.2.6. Bestimmung des Genotyps 31
2.2.2.3. Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion 32
2.2.2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 32
2.2.2.3.2. Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese 33
2.2.2.3.3. Ergebnis der Genotypisierung mittels PCR 33
2.2.2.4. Bestimmung der CD18-Expression mittels FACS-Analyse 34
2.2.3. Immunhistochemische Analyse 35
2.2.3.1. Peroxidase-Detektionssystem 35
2.2.3.2. Detektionssystem mit Alkalischer Phosphatase 35
2.2.3.3. Quantifizierung von Zellen 36
2.2.4. *In vivo* Depletion von T-Zellen 36
2.2.5. Magnetisches Zellsortieren (MACS) 37
2.2.6. Durchflusszytometrie (FACS) 37
2.2.6.1. Immunfluoreszenzfärbungen zellulärer Oberflächenstrukturen 38
2.2.6.2. Immunfluoreszenzfärbungen intrazellulärer Zytokine 38
2.2.7. Zytokinfreisetzung 39
2.2.7.1. Zytokinbestimmung mittels ELISA 39
2.2.7.2. Zytokinbestimmung mittels der „Cytometric Bead Array“ Technik (CBA) 39
2.2.8. Allergische Kontaktdermatitis (ACD) 40
2.2.9. Kopplungsanalyse 40
2.2.9.1. Vorbereiten der Genotypisierung mittels Mikrosatellitenanalyse 41
2.2.9.1.1. Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien (Denaturierung mittels Natriumhydroxid) 41
2.2.9.1.2. Datenbanksuche nach polymorphen Mikrosatellitenmarkern 41
2.2.9.2. Genotypisierung mittels Mikrosatellitenanalyse 41
2.2.9.2.1. Verwendete Mikrosatellitenmarker 41
2.2.9.2.2. Standardisierte PCR 42
2.2.9.2.3. Entsalzen der PCR-Produkte 42
2.2.9.2.4. Auftrennung und Längenbestimmung der PCR-Produkte 43
2.2.9.3. Berechnung der Kopplung 43
2.2.10. Statistische Auswertungen 44

3. Ergebnisse 45
3.1. Untersuchung der psoriasiformen Dermatitis im $CD18^{hypo}$ PL/J-Mausmodell 45
3.2. Schnellere Genotypisierung von $CD18^{hypo}$ und $CD18^{null}$ Mäusen durch eine PCR-gestützte Genotypisierungsmethode im Vergleich zur RFLP-Analyse 45
3.3. Charakterisierung des $CD18^{hypo}$ psoriasiformen Mausmodells 46
3.3.1. Quantitative Unterschiede in den α-Untereinheiten von β_2-Integrinen zwischen $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Leukozyten 46
3.3.2. Starke Vermehrung von T-Zellen und Makrophagen in psoriatischen Läsionen von $CD18^{hypo}$ Mäusen 48
3.3.3. T-Zellen mit vorwiegender Th1-Zytokin-Freisetzung in $CD18^{hypo}$ Mäusen 50
3.3.4. Erhöhte Aktivierung von $CD4^+$, nicht aber $CD8^+$ T-Zellen in $CD18^{hypo}$ Mäusen 53

3.4. Entscheidende Rolle von $CD4^+$, nicht aber $CD8^+$ T-Zellen bei der Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis ... 55
3.4.1. Abheilung psoriatischer Läsionen nach der Depletion von $CD4^+$ T-Zellen ... 55
3.4.2. Keine Auswirkung der Depletion von $CD8^+$ T-Zellen auf den psoriasiformen Phänotyp ... 58
3.5. Kein psoriasiformer Phänotyp bei $CD18^{null}$ Mäusen ... 61
3.6. Gestörtes Auswandern von T-Zellen als möglicher Grund für die Abwesenheit eines psoriasiformen Phänotyps bei $CD18^{null}$ Mäusen ... 62
3.6.1. Auslösung einer allergischen Kontaktdermatitis in $CD18^{wt}$ und $CD18^{hypo}$, nicht aber in $CD18^{null}$ Mäusen ... 62
3.6.2. Auswanderung von T-Zellen nach Auslösen einer allergischen Kontaktdermatitis in die Haut von $CD18^{wt}$ und $CD18^{hypo}$, nicht aber von $CD18^{null}$ Mäusen ... 64
3.7. Identifizierung von mit der psoriasiformen Dermatitis in $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen assoziierten Chromosomenabschnitten ... 65
3.7.1. Entwicklung eines schweren psoriasiformen Phänotyps bei 16 % der Nachkommen aus einer Rückkreuzung zwischen $CD18^{hypo}$ PL/J- und C57BL/6J-Mäusen ... 66
3.7.2. Auswahl von polymorphen Markern für die genomweite Mikrosatellitenanalyse ... 67
3.7.3. Stärkste Kopplung mit der psoriasiformen Dermatitis für einen Genort auf Chromosom 10 nach Analyse von 94 Mäusen der N2-Generation ... 69
3.7.4. Vermehrte Homozygotie für die in der Kopplungsanalyse ermittelten Marker von N2-Mäusen mit einem schweren psoriasiformen Phänotyp gegenüber unbetroffenen Mäusen ... 74
3.7.5. Keine Beeinflussung der Kopplungsanalyse durch die Lücke zwischen den Markern auf Chromosom 10 oder durch die im $CD18^{hypo}$ PL/J-Stamm auftretenden 129/SvEv-Allele ... 75
3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse ... 77

4. Diskussion ... 78

4.1. $CD4^+$ Th1-Zellen spielen bei der Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis eine entscheidende Rolle ... 78
4.2. Die CD18-Gendosis ist für die Ausprägung des psoriasiformen Phänotyps entscheidend ... 81
4.3. Das $CD18^{hypo}$ PL/J-Mausmodell ermöglicht die Identifizierung von mit der psoriasiformen Dermatitis assoziierten Chromosomenabschnitten ... 84
4.3.1. Die in $CD18^{hypo}$ Mäusen auftretenden 129/SvEv-Allele beeinflussen das Ergebnis der Kopplungsanalyse nicht ... 85
4.3.2. Für die Auslösung der psoriasiformen Dermatitis sind ein bis zwei, für den Schweregrad dagegen vier oder mehr PL/J-Allele verantwortlich ... 86
4.3.3. Die mit der psoriasiformen Dermatitis der $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäuse assoziierten Genorte könnten auch bei der Psoriasis des Menschen und anderen entzündlichen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen ... 89

5. Ausblick ... 92

6. Literaturverzeichnis ... 94

7. Abkürzungsverzeichnis 103

8. Anhang 105

Danksagung 110

Erklärung 111

Kurzzusammenfassung 112

Abstract 113

Lebenslauf 114

1. Einleitung

1.1. Aufbau der Haut

Die Haut als größtes Organ der Säugetiere erfüllt zahlreiche Funktionen. Sie grenzt den Organismus von der Außenwelt ab und schützt ihn vor schädigenden Einflüssen. Neben der Regulation von Temperatur, Wasserhaushalt und Stoffwechsel dient sie auch der Immunabwehr pathogener Erreger. Die Haut lässt sich in die Oberhaut (Epidermis) und die darunter liegende Lederhaut (Dermis) gliedern. Funktionell wird noch die Unterhaut (Subcutis) mit einem durch Bindegewebssepten stabilisierten Fettgewebe als Verschiebeschicht zur Haut gezählt. Die Epidermis wird in erster Linie von Keratinozyten gebildet. Diese wandern ausgehend von einer sich teilenden Basalzellschicht (*Stratum basale*) nach außen, wobei sie zunehmend differenzieren und durch die Expression von strukturell verschiedenen Keratinen stabilisiert werden, um schließlich als undurchlässige Hornschicht (*Stratum corneum*) den protektiven Abschluss zur Umgebung zu bilden (Peters et al. 2000). Komplett verhornte Zellen des *Stratum corneum* besitzen keine Zellkerne mehr und werden abgeschilfert. Neben den Keratinozyten finden sich in der Epidermis immunkompetente dendritische Zellen (Langerhans-Zellen), die als Mechanorezeptoren fungierenden Merkel-Zellen und Melanozyten, die das vor UV-Strahlung schützende Pigment Melanin produzieren. Durch eine unter der Basalzellschicht liegende Basalmembran wird die Epidermis vom Bindegewebe der Dermis getrennt. Die Dermis setzt sich aus Fibroblasten als häufigstem Zelltyp, Zellen der Immunabwehr (Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen), Endothelzellen der Kapillaren des Blutgefäßsystems und Epithelzellen der Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel und Drüsen zusammen. Die Zellen und in die Dermis reichende Nervenendigungen sind in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, die vornehmlich aus Kollagenfasern besteht.

1.2. Psoriasis vulgaris oder Schuppenflechte

Eine der häufigsten Hauterkrankungen ist die Psoriasis oder Schuppenflechte, an der durchschnittlich 2 % der Bevölkerung leiden (Tomfohrde et al. 1994). Für die Betroffenen ist sie mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden. Mit einem Anteil von über 90 % ist die Psoriasis vulgaris die überwiegende Form (Jung 1995). Daneben gibt es die Psoriasis arthropathica und Psoriasis pustulosa. Die Psoriasis vulgaris lässt sich in zwei Typen

einteilen. Dem Typ I werden schwere Fälle mit einem Manifestationsalter von 10 bis 25 Jahren zugeordnet. Diese Form der Psoriasis vulgaris ist erblich, wobei Kopplung mit Allelen der Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes („Major Histocompatibility Complex", MHC) nachgewiesen wurde. Beim Menschen wird der MHC als HLA- („Human Leukocyte Antigen"-) Komplex bezeichnet. Träger der Allele HLA-B13, -B57, -Cw6 und -DR7 zeigen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der psoriatischen Erkrankung (Barker 2001). Typ II zeigt weder eine familiäre Häufung noch eine Kopplung mit den genannten HLA-Allelen (Jung 1995). In diese Gruppe werden relativ leichte Fälle der Psoriasis vulgaris eingeordnet, bei denen sich die Erkrankung in einem Alter zwischen 35 und 60 Jahren entwickelt.

Die Psoriasis vulgaris ist klinisch als verdickte, gerötete Haut zu erkennen, die von silbrig glänzenden festhaftenden Schuppen bedeckt ist. Histologisch finden sich gegenüber gesunder Haut zahlreiche Veränderungen. Augenfällig ist eine Verbreiterung der Epidermis (Akanthose). Die Hornschicht ist stark verdickt (Hyperkeratose) und enthält Reste von Zellkernen (Parakeratose). Diese Merkmale lassen sich auf eine verstärkte Proliferation und gestörte Differenzierung der Keratinozyten zurückführen (Braun-Falco et al. 2000). DNA-Synthese und Mitoserate sind bei Psoriasispatienten um das 5 – 6-fache erhöht. Ein Zellzyklus wird in eineinhalb Tagen statt in zweieinhalb Wochen und somit 10-fach beschleunigt abgeschlossen. Dies führt dazu, dass sich die Zeit, die Keratinozyten zum Durchwandern der Epidermis vom *Stratum basale* zum *Stratum corneum* benötigen, von 28 Tagen auf 3 - 4 Tage verkürzt. Diese Zeit reicht aber zu ihrer Differenzierung nicht aus. Daher ist das *Stratum corneum* in psoriatischen Läsionen nicht vollständig verhornt und enthält noch Zellkerne. Die gestörte Differenzierung der Keratinozyten lässt sich auch anhand der von ihnen exprimierten Keratine erkennen. Während die Proliferations-assoziierten Keratine K6 und K16 verstärkt gebildet werden, sind die Differenzierungs-assoziierten Keratine K1 und K10 in der Epidermis von Psoriasispatienten vermindert exprimiert (Rao et al. 1996). Loricrin als Bestandteil des „Cornified Cell Envelope", einer sehr stabilen Struktur, die unter der Plasmamembran differenzierender Keratinozyten gebildet wird, ist ebenso wie ein weiterer später Differenzierungsmarker, das zum Verdichten der Keratine im *Stratum corneum* benötigte Filaggrin, stark vermindert (Ishida-Yamamoto et al. 2000). Weitere histologische Charakteristika der Psoriasis sind ein vermehrtes Vorkommen erweiterter Blutgefäße und ein starkes entzündliches Infiltrat in der Dermis (Jung 1995). T-Zellen finden sich auch in den unteren Schichten der Epidermis. Typisch sind Ansammlungen von Granulozyten unter dem *Stratum corneum*, die als Munro-Mikroabszesse bezeichnet werden.

1.2.1. Pathogenese der Psoriasis vulgaris

Die Pathogenese der Psoriasis vulgaris ist ein seit langem kontrovers diskutiertes Thema, wobei die Frage nach dem primären Auslöser im Mittelpunkt steht (Nickoloff et al. 2000). Veränderungen in Keratinozyten, neutrophilen Granulozyten oder T-Zellen, deren vermehrtes Auftreten für das Krankheitsbild von Psoriasispatienten charakteristisch ist, standen zur Diskussion. Aufgrund zahlreicher klinischer und experimenteller Hinweise ist der Stand der Forschung, dass es sich bei der Psoriasis um eine T-Zell-vermittelte immunologische Erkrankung handelt. Entsprechend stellen T-Zellen die Hauptakteure dar, die für den Entzündungsprozess, der der Psoriasiserkrankung zugrunde liegt, verantwortlich sind (Krueger 2002).

1.2.1.1. T-Zellen

Unter den Entzündungszellen, die während der psoriatischen Entzündungsreaktion in die Haut einwandern, sind T-Zellen am stärksten vertreten (Thivolet und Nicolas 1994, Valdimarsson et al. 1995). Sie sind sowohl in der Dermis als auch der Epidermis von psoriatischen Hautläsionen zu finden. T-Zellen oder Thymozyten werden im Thymus aus dem Knochenmark entstammenden Vorläuferzellen gebildet (Delves und Roitt 2000a). T-Zellen sind die Träger der zellulären Immunantwort und lassen sich in zwei Gruppen einteilen. T-Helfer- (Th-) Zellen, die aufgrund der Expression des Oberflächenmoleküls CD4 auch als $CD4^+$ T-Zellen bezeichnet werden, können jeweils passende Effektorfunktionen verschiedener Zelltypen des Immunsystems aktivieren und verstärken. Die Hauptaufgabe von zytotoxischen T- (Tc-) Zellen, die aufgrund der Expression des Oberflächenmoleküls CD8 auch als $CD8^+$ T-Zellen bezeichnet werden, ist es dagegen, infizierte Zellen direkt zum Zelltod zu führen. Weiterhin lassen sich T-Zellen auch nach den von ihnen produzierten Zytokinen - kleinen Glykoproteinen, die zumeist sezerniert werden und ganz unterschiedliche Wirkungen ausüben können - einteilen (Delves und Roitt 2000b). Produzieren T-Zellen vornehmlich Interferon-γ (IFN-γ) sowie das Interleukin IL-2, ordnet man sie dem Th1-Typ zu. Überwiegen dagegen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, spricht man vom Th2-Typ. Als dritte Subpopulation unterscheidet man Th3-Zellen, die vornehmlich den transformierenden Wachstumsfaktor-β (TGF-β) freisetzen (Weiner 2001).

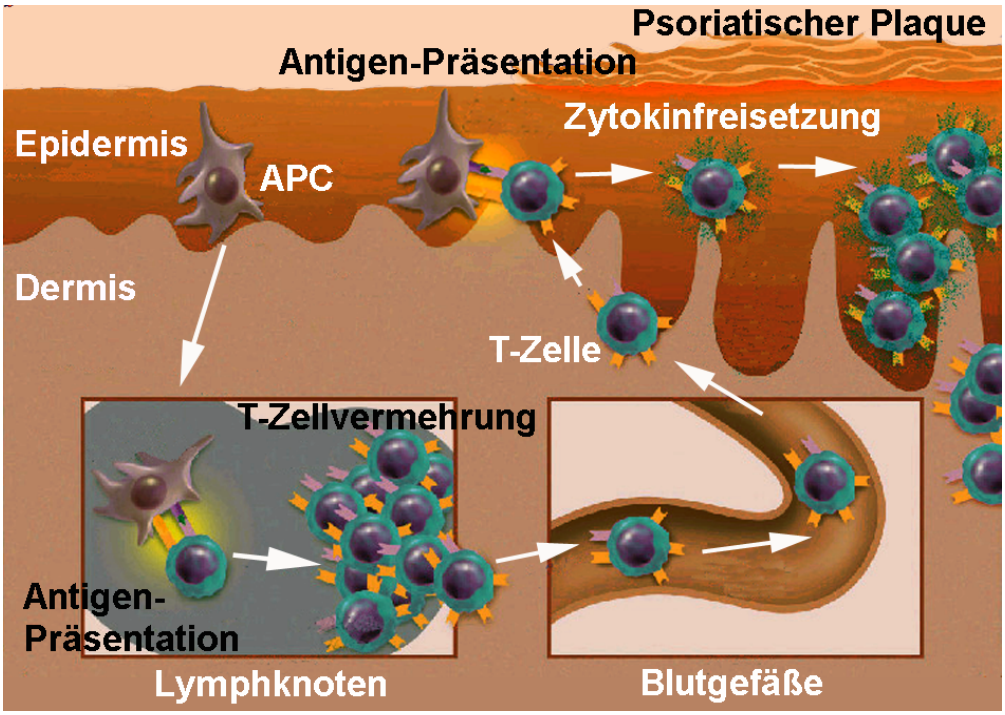


Abb. 1 *Zentrale Rolle von T-Zellen bei der psoriatischen Entzündungsreaktion.*
Antigen-präsentierende Zellen (APC) in der Epidermis nehmen körperfremde Stoffe auf und wandern in die Haut dränierende Lymphknoten, wo sie Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren. T-Zellen, die mit den dargebotenen Antigenen reagieren, vermehren sich und gelangen über den Blutstrom in die Haut. Werden ihnen dort erneut spezifische Antigene von Antigen-präsentierenden Zellen dargeboten, setzen sie Zytokine frei, über die sie Einflüsse auf weitere T-Zellen, aber auch andere die Entzündung unterhaltende Zelltypen ausüben können. Letztendlich setzt dies einen Entzündungsprozess in Gang, der als Ursache für die Entstehung psoriatischer Plaques angesehen wird. (nach Grabbe und Schwarz 1998)

1.2.1.2. Schema einer T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion

Bei einer intakten T-Zell-vermittelten (adaptiven) Immunabwehr erkennen die T-Zellen spezifische Antigene. Diese werden ihnen von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) dargeboten, die körperfremde Stoffe aufnehmen, verarbeiten und schließlich gebunden an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC-Moleküle) auf der Oberfläche präsentieren (Abb. 1). Antigene, die im Kontext mit MHC Klasse-I-Molekülen dargeboten werden, werden von $CD8^+$ T-Zellen erkannt, während $CD4^+$ T-Zellen mit Antigenen reagieren, die auf MHC Klasse-II-Molekülen präsentiert werden (Delves und Roitt 2000a). T-Zellen binden über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) nur an die für sie spezifischen Antigene. Durch dieses primäre Signal und zusätzliche sekundäre Signale werden sie aktiviert (Robert und Kupper 1999). Die kostimulatorischen Signale kommen durch Bindungen zwischen Oberflächenmolekülen von T-Zelle (CD2, CD28, LFA-1) auf der einen Seite und Antigen-präsentierender Zelle (LFA-3,

B7, ICAM-1) auf der anderen Seite zustande. Aktivierung und nachfolgende Vermehrung der T-Zellen findet in den Lymphknoten statt. Danach werden die T-Zellen in den Blutstrom entlassen und können mittels spezifischer Oberflächenmoleküle (CLA, L-Selektin, Integrine, Chemokinrezeptoren) in ihr Zielgewebe, in diesem Fall die Haut, gelangen. Treffen sie dort erneut auf die für sie spezifischen Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert werden, setzen sie als Reaktion Zytokine frei, über die sie Einflüsse auf weitere T-Zellen, aber auch andere die Entzündung unterhaltende Zelltypen ausüben können. Letztendlich setzt dies einen Entzündungsprozess in Gang, der ursprünglich der Abwehr von körperfremden Erregern dient.

1.2.1.3. Psoriasis vulgaris als Autoimmunerkrankung

Bei der Pathogenese der Psoriasis geht man von einem ähnlichen Ablauf aus. Man nimmt an, dass es sich bei dem Antigen, das von den an der Krankheitsentstehung beteiligten T-Zellen erkannt wird, nicht um ein körperfremdes, sondern um ein körpereigenes Antigen handelt, weshalb die Psoriasis vulgaris als Autoimmunerkrankung betrachtet wird (Breathnach und Phillips 1996, Prinz 1997, Valdimarsson et al.1995). Die Suche nach diesem epidermalen Selbst-Antigen verlief bislang allerdings erfolglos (Lin et al. 2001, Prinz 2001).

1.2.2. Blockierung der T-Zellfunktion als Behandlungsstrategie der Psoriasis vulgaris

Auf der Grundlage des gewachsenen Verständnisses für die immunologischen Vorgänge bei der Entstehung der Psoriasis sind neue Behandlungsstrategien seit einiger Zeit auf die Blockierung der T-Zellfunktion in psoriatischen Läsionen gerichtet (Krueger 2002). Zu diesem Zweck werden Antikörper eingesetzt, die gegen unterschiedliche Oberflächenmoleküle von T-Zellen beziehungsweise von Antigen-präsentierenden Zellen gerichtet sind. Entsprechend wurde die Wirksamkeit der Blockade von CD2- (Ellis und Krueger 2001), CD4- (Bachelez et al. 1998, Gottlieb et al. 2000b, Morel et al. 1992) oder IL-2-Rezeptor- (IL-2R-) Molekülen (Bagel et al. 1998, Gottlieb et al. 1995, Krueger et al. 2000, Mrowietz et al. 2000, Owen und Harrison 2000) auf T-Zellen beziehungsweise B7-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen (Abrams et al. 1999) bereits in klinischen Studien gezeigt. Weiterhin wurde ein humanisierter anti-CD11a mAk erfolgreich in klinischen Studien eingesetzt, wobei es bei den behandelten Psoriasispatienten zu eindrucksvollen klinischen und histologischen Verbesserungen kam (Gottlieb et al. 2000a, Papp et al. 2001).

1.3. Auswanderung entzündlicher Zellen

T-Zellen benötigen die Anwesenheit ihrer spezifischen Antigene in der Haut, damit sie vor Ort aktiviert werden und ihre Wirkung ausüben können. Um in Kontakt mit diesen Antigenen zu kommen, müssen sie zunächst aus den Blutgefäßen in das Gewebe gelangen. Die Auswanderung von T-Zellen, aber auch anderer entzündlicher Zellen, wie Monozyten, die im Gewebe zu Makrophagen differenzieren, und Granulozyten, beruht auf einer Abfolge von Wechselwirkungen zwischen Adhäsionsmolekülen auf im Blutstrom zirkulierenden Immunzellen einerseits und residenten Endothelzellen andererseits. Dieser Vorgang lässt sich in folgende Schritte gliedern. Zunächst fangen Endothelzellen, die die Innenwand der Blutgefäße bilden, die schnell dahinfließenden Leukozyten Selektin-vermittelt aus dem Blutstrom heraus und bremsen sie ab. P- beziehungsweise E-Selektine, die auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen exprimiert werden, binden den P-Selektin Glykoprotein-Liganden-1 (PSGL-1) auf Immunzellen. Auch das kutane Lymphozyten-Antigen (CLA) kann als Ligand (Gegenrezeptor) für das E-Selektin fungieren. Umgekehrt erkennt L-Selektin, das auf Leukozyten exprimiert wird, PNAd („Peripheral Lymphnode Adressin“) auf Endothelzellen. Diese Bindungen sind schwach, und im Blutstrom lösen sich die Immunzellen von den Endothelzellen. Eine kurze Strecke weiter haften sie aber an einer anderen Stelle über die gleichen Wechselwirkungen wieder an Endothelzellen an. Aufgrund dieses Wechsels von Assoziation und Dissoziation rollen die Leukozyten die Gefäßinnenwand entlang. Zum vollständigen Anhalten der Rollbewegung werden zusätzliche Wechselwirkungen benötigt, die zur festen Bindung der Immunzellen an die Gefäßwand führen. Diese stärkere Zell-Zell-Adhäsion wird durch den Kontakt von β_1- und β_2-Integrinen auf Leukozyten mit ihren Liganden auf Endothelzellen, zu denen das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 sowie die interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und -2 gehören, vermittelt. Bevor eine solche Bindung zustande kommen kann, müssen die Integrine zunächst aktiviert werden. Dies geschieht während der Rollbewegung, wenn Chemokine - chemotaktische Zytokine, die von den Endothelzellen freigesetzt werden - an ihre spezifischen Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der Immunzellen binden. Sitzen die Leukozyten fest an der Gefäßwand, flachen sie ab und wandern schließlich zwischen benachbarten Endothelzellen ins Gewebe.

1.4. β_2-Integrine

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, die sich aus nicht-kovalent assoziierten α- und β-Untereinheiten zusammensetzen und als Zelloberflächenrezeptoren fungieren (Hynes 1992, Van der Flier und Sonnenberg 2001). Zur Zeit sind in Vertebraten 18 α- und acht β-Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Rezeptoren bilden. Die größte Unterfamilie ist die β_1-Familie, zu der 12 Heterodimere gehören. Ursprünglich wurden die Integrine nach ihrer Bedeutung für die strukturelle Integrität von Zellen und Geweben benannt, da die Interaktion der Zelle mit der extrazellulären Matrix hauptsächlich durch die Integrine vermittelt wird (Hynes 1999). Während die meisten anderen Integrine vorwiegend oder ausschließlich als Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix fungieren, vermitteln die Integrine der β_2-Familie überwiegend Zell-Zell-Wechselwirkungen.

β_2-Integrine (CD11/CD18) sind Adhäsionsmoleküle, die nur auf der Oberfläche von Leukozyten gebildet werden. Den Mitgliedern dieser Familie gemeinsam ist die β_2-Kette (CD18), die mit vier verschiedenen α-Untereinheiten (αL, αM, αX und αD) funktionelle Heterodimere bilden kann (Abb. 2). Je nach α-Kette (CD11) werden diese LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), gp150,95 (CD11c/CD18) und CD11d/CD18 genannt (Arnaout 1990, Hynes 1987, Van der Vieren et al. 1995). β_2-Integrine interagieren mit mehr als 20 Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie (Carlos and Harlan 1994, Springer 1994). Zu den bekanntesten zählen die interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM). β_2-Integrine sind für Zell-Zell-Kontakte bei einer Reihe von entzündlichen Vorgängen verantwortlich (Anderson et al. 1986, Hynes 1987).

1.5. Rolle von β_2-Integrinen bei der Psoriasis vulgaris des Menschen

Die pathogene Rolle von β_2-Integrinen bei der Psoriasis des Menschen ist weitgehend ungeklärt. Die CD11b-Expression auf Leukozyten des peripheren Blutes von Psoriasispatienten ist verringert (Neumüller et al. 2001, Van Pelt et al. 1997). Ein weiteres Indiz, dass eine verminderte CD18-Expression ursächlich bei der Entstehung einer psoriasiformen Dermatitis beteiligt sein könnte, stammt aus der klinischen Beobachtung, dass einige Patienten, die am Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndrom I leiden und bei denen die CD18-Expression nur geringfügig reduziert ist, eine psoriasiforme Dermatitis entwickeln (Van de Kerkhof und Weemaes 1990). Bei Kopplungsanalysen von Psoriasis-Familien wurden Regionen auf den

Chromosomen 19 und 17 identifiziert, die zusätzlich zu anderen Genorten mit ICAM-1 und ICAM-2 zwei der bedeutendsten Liganden von β_2-Integrinen enthalten (Lee et al. 2000, Tomfohrde et al. 1994). Schließlich können Polymorphismen im CD18-Gen für Autoimmunkrankheiten prädisponieren, indem sie entweder zu einer höheren Ligandenaffinität oder einer gesteigerten Expression des CD18-Proteins führen (Gencik et al. 2000, Meller et al. 2001).

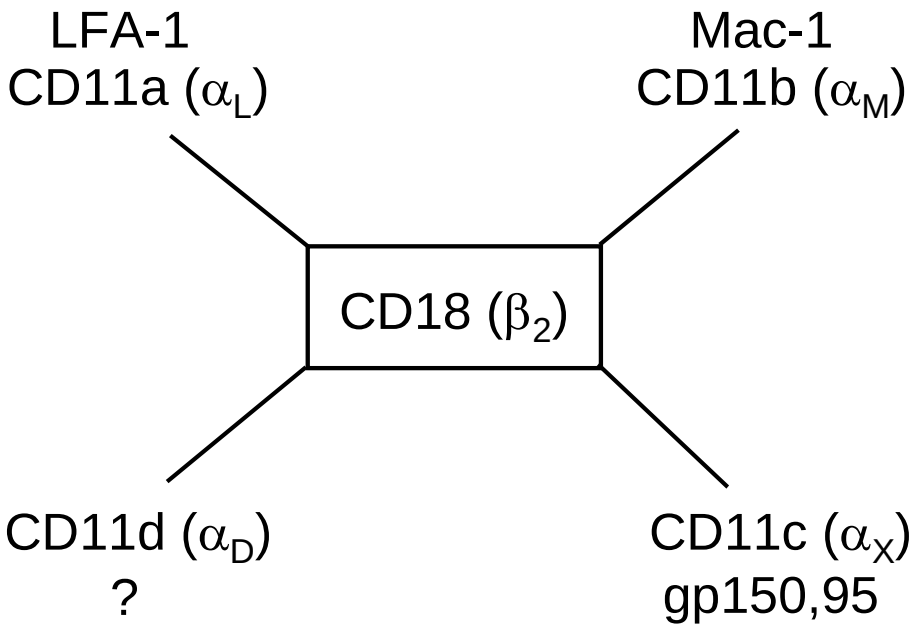


Abb. 2 *Die Familie der β_2-Integrine.*
β_2-Integrine sind durch eine gemeinsame β_2-Kette (CD18) gekennzeichnet, die mit vier verschiedenen α-Untereinheiten (αL, αM, αX und αD) funktionelle Heterodimere bildet. Je nach α-Kette (CD11) werden diese LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), gp150,95 (CD11c/CD18) und CD11d/CD18 genannt.

1.6. CD18-defiziente Mausmodelle

Eine Methode, die Funktion bestimmter Proteine im lebenden Organismus zu bestimmen, ist das Ausschalten der kodierenden Gene im Mausmodell. Für das CD18-Protein wurden in zwei Ansätzen CD18-defiziente Mauslinien generiert. Zunächst wurde eine Maus generiert, die noch eine CD18-Restexpression von 2 - 16 % der Wildtyp-Expression zeigt (siehe 1.6.2.). Diese hypomorphe CD18-Mutation führt bei Mäusen des PL/J-Stammes zur Ausbildung einer psoriasiformen Dermatitis. Dagegen stellen Mäuse mit einer CD18-Nullmutation ein Modell für die schwerste Form des Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndroms I dar (siehe 1.6.1.).

1.6.1. Fehlen von CD18 beim Menschen und bei der Maus

Die stabile Anheftung von Entzündungszellen an das Gefäßendothel ist für die erfolgreiche Entzündungsreaktion notwendig und wird zentral durch β_2-Integrine vermittelt. Entsprechend führt das Fehlen von CD18 zur Ausbildung des Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndroms I (LAD1) (Beatty et al. 1984, Kishimoto et al. 1987, Kuijpers et al. 1997). Das LAD1 ist ein seltenes, autosomal-rezessiv vererbtes Immundefizienzsyndrom, das durch heterogene Mutationen im CD18-Gen verursacht wird. Patienten zeigen Wundheilungsstörungen und eine deutliche Vermehrung von Leukozyten (Leukozytose) im peripheren Blut. Es gibt leichte und schwere Formen, wobei der Schweregrad dieser Erkrankung mit dem Ausmaß des Verlustes an CD18 korreliert (Anderson et al. 1995, Anderson et al. 1985). Die Expression von weniger als 1 % des CD18-Proteins verursacht eine schwere Form der Erkrankung mit rezidivierenden lebensbedrohlichen mikrobiellen Infektionen, die bereits früh in der Kindheit zum Tod der Patienten führen können (Fischer et al. 1983, Anderson et al. 1985). Die Infektionen treten an Schleimhäuten und der Haut auf. In Abwesenheit von CD18 kommt es zu schweren Defekten bei Wechselwirkungen zwischen Zellen, die zu einem Verlust der homotypischen Lymphozytenadhäsion (Koopman et al. 1992, Mentzer et al. 1985, Rothlein und Springer 1986) und einer gestörten T-Zellaktivierung (Bachmann et al. 1997, Davignon et al. 1981, Scharffetter-Kochanek et al. 1998, Schönlau et al. 2000) führen, und mit einer verminderten Interleukin-2 (IL-2) Freisetzung einhergehen (Schönlau et al. 2000, Shier et al. 1996).
Mäuse mit einer CD18-Nullmutation ($CD18^{null}$) wurden auf einem gemischten 129/Sv- und C57BL/6J-Hintergrund generiert (Scharffetter-Kochanek et al. 1998). Sie zeigen alle Hauptmerkmale der humanen Erkrankung und dienen als Modell für das LAD1. $CD18^{null}$ Mäuse weisen eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, schwere Wundheilungsstörungen, eine massiv erhöhte Anzahl an Neutrophilen, B- und T-Zellen im peripheren Blut und ein vollständiges Fehlen von Neutrophilen in den spontan auftretenden Ulzerationen (Geschwürbildungen) auf. Für die $CD18^{null}$ Mäuse konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der β_2-Integrin-Untereinheit die Auswanderung von T-Zellen aus Blutgefäßen verhindert (Grabbe et al. 2002).

1.6.2. CD18 hypomorphes Mausmodell

1.6.2.1. Generierung der CD18 hypomorphen Mutation

Bei der Generierung der zuvor beschriebenen Nullmutation wurde in dem genomischen Bereich mit den Exons 2 und 3 des CD18-Gens (Abb. 3*A*) eine Neomycin-Kassette (Neo) am 5´-Ende des Exons 3 eingefügt (Abb. 3*C*). Das gleiche Konstrukt, das für die Erzeugung der Nullmutation eingesetzt wurde (Abb. 3*B*), wurde auch bei der Generierung einer weiteren Mausmutante verwendet (Wilson et al. 1993). Hierbei kam es nicht zu einem Ersetzen des genomischen Bereichs der Wildtyp-Maus (Abb. 4*A*), sondern zu einem Insertionsereignis, bei dem das komplette Konstrukt (Abb. 4*B*) an einer Hind III-Schnittstelle kurz vor dem Exon 2 in die DNA eingebaut wurde. Mäuse mit dieser Mutation tragen jeweils zwei Kopien der Exons 2 und 3 des CD18-Gens, wobei eine Neomycin-Kassette (Neo) am 5´-Ende des neu eingebrachten Exons 3 eingefügt ist (Abb. 4*C*). Wie bei der CD18-Nullmutation zerstört die Neomycin-Kassette die Sequenz am Übergang von Intron 2 zu Exon 3 und verhindert so die Synthese des CD18-Proteins. Allerdings enthält die Sequenz des miteingebauten Vektors einen kryptischen Promotor und zwei kryptische Exons. Am Promotor wird eine zusätzliche Transkription des CD18-Gens gestartet. Das resultierende Transkript entspricht dem Wildtyp-Transkript, außer dass das Exon 1 durch ein kryptisches Exon ersetzt ist. Da das Startcodon für die Translation im Exon 2 liegt, führt das mutierte Transkript zur Bildung eines CD18-Proteins, das sich nicht von dem einer Wildtyp-Maus unterscheidet. Lediglich in der Menge zeigen sich deutliche Unterschiede. Durch die Mutation kommt es zu einer starken Verminderung der CD18-Expression auf lediglich 2 % der Wildtyp-Menge in ruhenden und 16 % in aktivierten Leukozyten (Wilson et al. 1993). Daher wurde sie als hypomorphe CD18-Mutation ($CD18^{hypo}$) bezeichnet.

Die Mutation wurde in einer embryonalen Stammzell-Linie des Mausstammes 129/SvEv (AB1) erzeugt. Die embryonalen Stammzellen wurden in Blastozysten des C57BL/6J-Stammes injiziert und Männchen, die die Mutation trugen, mit C57BL/6J-Weibchen verpaart. Ausgehend von den Nachkommen dieser Verpaarung wurde die $CD18^{hypo}$ Mutation sowohl auf den C57BL/6J- als auch auf den 129/SvEv-Stamm rückgezüchtet. Schließlich wurde die Mutation ausgehend vom $CD18^{hypo}$ 129/SvEv-Inzuchtstamm vier Generationen auf den PL/J-Stamm rückgezüchtet.

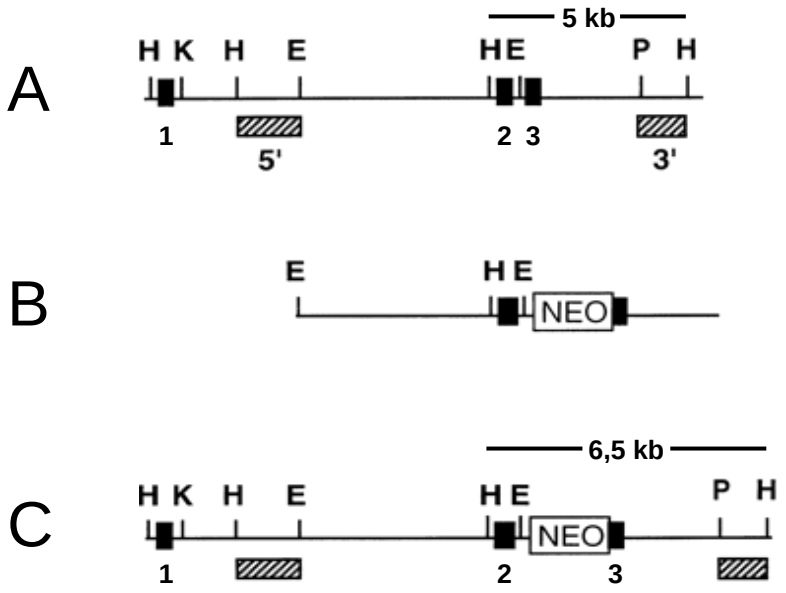


Abb. 3 *Erzeugung der CD18 Nullmutation.*
(*A*) Restriktionskarte der genomischen Region mit den Exons 1 - 3 des CD18-Gens. Angegeben sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoR I (E), Hind III (H), Kpn I (K) und Pst I (P). Nach Schneiden mit Hind III kann durch Hybridisierung mit der Sonde auf der 3´-Seite des Exons 3 ein Fragment der Länge 5 kb detektiert werden. (*B*) Ausschnitt des Konstruktes, das für die homologe Rekombination eingesetzt wurde. Es wurde das gleiche Konstrukt, wie bei der Erzeugung der CD18 hypomorphen Mutation verwendet (Abb. 4*B*). (*C*) Genomische DNA nach Einbau des Konstruktes. Mittels homologer Rekombination wurden die Exons 2 und 3 des CD18-Gens durch die des Konstruktes ersetzt. Nach Schneiden mit dem Restriktionsenzym Hind III kann mit der 3´-Sonde ein Fragment der Länge 6,5 kb detektiert werden. (nach Scharffetter-Kochanek et al. 1998)

1.6.2.2. Psoriasiforme Dermatitis bei CD18 hypomorphen PL/J-Mäusen

Aufgrund der hypomorphen Mutation im CD18-Gen entwickelt sich bei PL/J-Mäusen eine Hauterkrankung, die der Psoriasis vulgaris des Menschen (siehe 1.2.) sowohl in den klinischen und histologischen Merkmalen als auch im Ansprechen auf Therapien stark ähnelt (Bullard et al. 1996). Betroffene Mäuse zeigen Hautrötungen (Erytheme), Haarverlust (Alopezie), Krusten- und Schuppenbildung, abnorme Keratinozytenproliferation beziehungsweise -differenzierung, Mikroabszesse unter der Hornhaut, ein gesteigertes entzündliches Infiltrat und erweiterte Blutgefäße in der Dermis. Wie bei Patienten mit schwerer Psoriasis (Feldman et al. 2001, Lebwohl und Ali 2001, Van de Kerkhof und Franssen 2001) kann auch die psoriasiforme Dermatitis dieses Mausmodells durch Kortikosteroide (Dexamethason) unterdrückt werden, was auf die Beteiligung eines autoimmunen oder anderweitig entzündlichen Prozesses schließen läßt (Bullard et al. 1996).

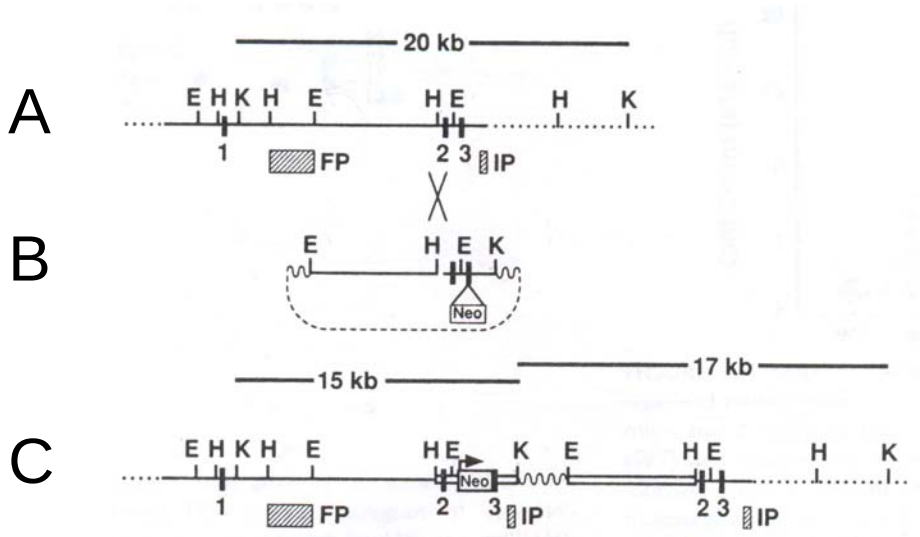


Abb. 4 *Erzeugung der CD18 hypomorphen Mutation.*
(*A*) Restriktionskarte der genomischen Region mit den Exons 1 - 3 des CD18-Gens. Angegeben sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoR I (E), Hind III (H) und Kpn I (K). Nach Schneiden mit Kpn I ergibt sich ein Fragment der Länge 20 kb. Dieses kann sowohl durch Hybridisierung mit der flankierenden Sonde (FP), als auch mit der internen Sonde (IP) detektiert werden. (*B*) Konstrukt, das für die homologe Rekombination eingesetzt wurde. Es reicht von der EcoR I-Schnittstelle zwischen den Exons 1 und 2 bis kurz hinter das 3´-Ende der internen Sonde. Die Kpn I-Schnittstelle befindet sich im Vektorplasmid (gewellte und gestrichelte Linie). Eine Neomycin-Kassette (Neo) ist am 5´-Ende des Exons 3 eingefügt. (*C*) Genomische DNA nach Einbau des Konstruktes. Durch Insertion an der Hind III-Schnittstelle kurz vor dem Exon 2 wurden die Exons 2 und 3 und die Region, die die interne Sonde enthält, dupliziert. Die eingebaute Sequenz ist als doppelter Strich gekennzeichnet. Nach Schneiden mit dem Restriktionsenzym Kpn I kann mit FP ein Fragment der Länge 15 kb und mit IP neben diesem eines der Länge 17 kb detektiert werden. (nach Wilson et al. 1993)

1.6.2.3. Die psoriasiforme Dermatitis als Modell einer polygenen Erkrankung

Die psoriasiforme Dermatitis tritt nur bei CD18^{hypo} Mäusen des PL/J-, nicht aber des C57BL/6J- oder 129/Sv-Inzucht-Mausstammes auf. CD18^{hypo} 129/Sv- und PL/J-Mäuse zeigen eine vergleichbare CD18-Expression, weshalb eine unterschiedlich ausgeprägte Defizienz an CD18 als Ursache für ihre Suszeptibilität beziehungsweise Resistenz ausgeschlossen werden konnte (Bullard et al. 1996). Da die Unterschiede zwischen suszeptiblen und resistenten Stämmen auf verschiedenen Sequenzen des mutierten CD18-Gens beruhen könnten, wurden alle Exons dieses Gens, einschließlich der duplizierten Exons 2 und 3, in PL/J- und C57BL/6J-Mäusen sequenziert (Barlow et al. 2003). Dabei konnten keine Polymorphismen in den kodierenden Regionen des CD18-Gens gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass neben der CD18^{hypo} Mutation weitere Genorte für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich sind. Daher handelt es sich bei der psoriasiformen Dermatitis der CD18^{hypo} PL/J-Mäuse um eine polygene Erkrankung.

Rückkreuzungsexperimente (Abb. 5 oben) zwischen dem suszeptiblen PL/J- und dem resistenten C57BL/6J-Stamm belegten diese Annahme. Während $CD18^{hypo}$ Mäuse der (PL/J x C57BL/6J) F1-Generation keine Erkrankung entwickelten, zeigten nach Verpaarung der F1-Mäuse mit dem suszeptiblen PL/J-Stamm 50 % der Tiere der N2-Generation Anzeichen der psoriasiformen Dermatitis (Bullard et al. 1996). Daraus lässt sich schließen, dass neben CD18 nur eine kleine Anzahl weiterer Gene die Suszeptibilität für die Erkrankung beeinflusst. Die Abwesenheit des psoriasiformen Phänotyps in der F1-Generation deutet darauf hin, dass zumindest für eines dieser Gene das PL/J-Allel rezessiv gegenüber dem C57BL/6J-Allel ist.

1.7. Genetische Analyse polygener Erkrankungen

Erblich bedingte Erkrankungen folgen nicht immer einem monogenen Erbgang, bei dem der Genotyp eines einzelnen Gens darüber entscheidet, ob eine Krankheit auftritt oder nicht. Viel häufiger wird dies durch eine Reihe von Genen beeinflusst (polygener Erbgang). Spielen neben den genetischen auch Umweltfaktoren eine Rolle, spricht man von einer multifaktoriellen oder komplexen Erkrankung. Solche Erkrankungen sind durch eine große Heterogenität im Phänotyp gekennzeichnet.

1.7.1. Psoriasis als polygene Erkrankung

Bei der Psoriasis vulgaris handelt es sich um eine komplexe Erkrankung, die durch äußere Faktoren, wie Streptokokkeninfektionen, Stress oder Trauma (Köbner-Phänomen) ausgelöst werden kann (Ameen 2003, Elder et al. 2001). Die genetische Grundlage der Psoriasis zeigte sich anhand epidemiologischer Studien und Zwillingsanalysen. Zum einen trat die Erkrankung bei Verwandten von Psoriasispatienten viel häufiger auf als bei Kontrollpersonen (Hellgren 1967, Henseler und Christophers 1985, Lomholt 1963) und zum anderen war die Konkordanzrate (Anzahl an Übereinstimmungen) bei monozygoten im Vergleich zu dizygoten Zwillingen viermal so hoch, was auf eine Erblichkeit zwischen 60 und 90 % schließen ließ (Brandrup et al. 1982, Duffy et al. 1993).
Durch Kopplungsanalysen (siehe 1.7.4.) wurden bereits einige Genorte identifiziert, die an der Manifestation der Psoriasis beteiligte Gene zu enthalten scheinen. Sieben dieser Genorte, die die stärkste Kopplung zeigten, wurden als PSORS1 - 7 bezeichnet. Sie liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p; PSORS1; Nair et al. 1997, Trembath et al. 1997), auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q; PSORS2; Tomfohrde et al. 1994), auf 4q (PSORS3;

Matthews et al. 1996), 1q (PSORS4; Capon et al. 1999), 3q (PSORS5; Enlund et al. 1999), 19p (PSORS6; Lee et al. 2000) beziehungsweise 1p (PSORS7; Veal et al. 2001). In den verschiedenen Studien konnte am häufigsten für PSORS1 eine Verbindung zur Psoriasis gezeigt werden. Da dieser Genort gleichzeitig die stärkste Kopplung zeigte, ist er bisher der mit Abstand am besten untersuchte. Obwohl der chromosomale Bereich bereits stark eingeschränkt wurde und nur wenige Gene enthält, konnte für PSORS1 das an der Manifestation der Psoriasis beteiligte Gen noch nicht identifiziert werden. Die anderen Genorte traten nur in einzelnen Studien auf und waren zum Teil in anderen Patientenkollektiven nicht reproduzierbar.

1.7.2. Untersuchung polygener Erkrankungen im Mausmodell

Die schwierige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Kopplungsanalysen stellt beim Menschen ein Problem bei der Suche nach Krankheits-assoziierten Genen dar. Die Ursache liegt in der großen Heterogenität komplexer Erkrankungen. Zum einen können verschiedene Gene oder Genvarianten zur Entstehung des gleichen Phänotyps führen, und zum anderen gibt es Variationen im klinischen Phänotyp. Auch Umweltfaktoren können eine Rolle spielen. Da die Unterschiede gerade zwischen ethnischen Gruppen sehr groß sein können, ist es nicht günstig, diese in einer Studie zu vereinen. Dadurch wird es aber umso schwieriger, eine ausreichende Menge an Familien, bei denen die Erkrankung auftritt, für die Kopplungsanalyse zu genotypisieren.

Daher werden, soweit verfügbar, immer häufiger Mausmodelle eingesetzt, um Gene zu identifizieren, die für die Entstehung komplexer Krankheiten verantwortlich sind. Anschließend wird überprüft, ob die homologen Gene auch bei den Erkrankungen des Menschen eine Rolle spielen. Der Vorteil von Nagermodellen ist, dass Verpaarungen gezielt vorgenommen werden können. Man erhält zahlreiche Nachkommen vom gleichen Elternpaar, und durch die Verwendung von Inzuchtstämmen kann die genetische Variabilität gering gehalten werden. Der Phänotyp der erkrankten Tiere kann genau definiert und in Subphänotypen unterteilt werden. Außerdem kann der Umwelteinfluss durch die Haltung der Tiere unter konstanten Bedingungen begrenzt werden.

Kopplungsanalysen bei Nagermodellen wurden bereits erfolgreich für verschiedene komplexe Erkrankungen durchgeführt. So trugen sie unter anderem zur Aufklärung der Tumorsuszeptibilität bei Neoplasien (Devereux und Kaplan 1998, Lan et al. 2001, Shepel et al. 1998), der arteriellen Hypertonie (Hoit und Nadeau 2001, Jacob et al. 1991, Monti et al. 2003) und der rheumatischen Arthritis (Olofsson et al. 2003, Vingsbo-Lundberg et al. 1998) bei.

1.7.3. Rückkreuzung von Mäusen

Um genetische Unterschiede zwischen einem für eine Erkrankung suszeptiblen und einem resistenten Mausstamm feststellen zu können, müssen die Tiere zunächst nach einem festgelegten Schema verpaart werden. Eine Möglichkeit stellt die Rückkreuzung dar (Abb. 5 oben), bei der ein resistenter Inzuchtstamm (dunkelgraue Maus) mit einem suszeptiblen (weiße Maus) verpaart wird. Nachkommen der F1-Generation (hellgraue Maus) werden anschließend auf einen der Elternstämme - in dem dargestellten Fall auf den suszeptiblen Stamm - rückgekreuzt. Die Nachkommen bezeichnet man als N2-Generation.
Mäuse tragen 20 Chromosomenpaare. Inzuchtstämme sind dadurch charakterisiert, dass nicht nur beide Kopien eines Chromosoms innerhalb eines Individuums identisch sind, sondern sich auch zwischen einzelnen Mäusen des Stammes nicht unterscheiden. Beispielsweise tragen alle Mäuse des resistenten Inzuchtstammes das gleiche Chromosom 1. Dieses unterscheidet sich aber vom Chromosom 1 des suszeptiblen Inzuchtstammes. Nachkommen der F1-Generation erhalten jeweils ein Chromosom von beiden Elternstämmen und tragen alle den gleichen Chromosomensatz. Verpaart man diese Tiere mit dem suszeptiblen Inzuchtstamm, wird an alle Nachkommen der N2-Generation vom Inzuchtstamm immer der gleiche Chromosomensatz vererbt. Die von den F1-Mäusen stammenden Chromosomen können dagegen ganz unterschiedlich sein. In der Meiose der F1-Tiere wird der doppelte Chromosomensatz zu einem einfachen reduziert. Bei diesem Vorgang kann es zu Überkreuzungen („Crossing-over“) zwischen den homologen Chromosomen kommen. Die Rekombinationshäufigkeit wird in Zentimorgan (cM) angegeben. Beim Menschen entspricht ein cM einer Rekombination in einem Chromosomenabschnitt von einer Million Basen (Mb). Durch das Auftreten von Rekombinationen an verschiedenen Stellen auf allen 20 Chromosomen kommt es zu einer großen Vielfalt an Genotypen unter den Mäusen der N2-Generation. Korreliert man diese in einer Kopplungsanalyse mit den Phänotypen der Tiere bezüglich der untersuchten Krankheit, kann man Chromosomenbereiche identifizieren, die für die Erkrankung von Bedeutung sind.

1.7.4. Kopplungsanalysen

Bei der beschriebenen Rückkreuzung tragen Mäuse der N2-Generation immer ein Chromosom des suszeptiblen Inzuchtstammes, auf den sie rückgekreuzt wurden. Je nachdem, ob sie von ihrem F1-Elternteil einen Chromosomenbereich des suszeptiblen oder des resistenten Stammes erhalten, sind sie homozygot oder heterozygot für den entsprechenden Bereich. Um

für alle Chromosomen festzustellen, welche Abschnitte von welchem der beiden Inzuchtstämme stammen, wird jede einzelne Maus der N2-Generation mittels einer genomweiten Mikrosatellitenanalyse genotypisiert. Mikrosatelliten kommen an vielen Stellen im Genom vor und bestehen aus einer sich mehrmals wiederholenden sehr kurzen DNA-Sequenz. Häufig findet man beispielsweise zahlreiche hintereinander geschaltete Kopien des Dinukleotids CA. Die Anzahl der Wiederholungen ist in einem bestimmten Inzuchtstamm konstant. Sie unterscheidet sich aber oft zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen. In diesem Fall kann man durch die Ermittlung der Länge einer Mikrosatellitenregion feststellen, von welchem Mausstamm der entsprechende Chromosomenbereich kommt. Durch die Verwendung solcher Mikrosatellitenmarker, die in regelmäßigen Abständen über die 20 Chromosomen verteilt sind, kann man letztendlich das gesamte Genom der Mäuse analysieren.

Um Aufschlüsse darüber zu erhalten, wie sich ein bestimmter Genotyp auf den Phänotyp bezüglich der untersuchten Erkrankung auswirkt, werden diese beiden Komponenten in einer Kopplungsanalyse miteinander verglichen (Abb. 5 unten). Im Prinzip wird jeder einzelne Marker betrachtet. Alle Mäuse, die für den jeweiligen Marker homozygot sind, werden in einer Gruppe zusammengefasst und alle heterozygoten Tiere in einer zweiten Gruppe. Anschließend werden die Phänotypen der Mäuse zwischen den beiden Gruppen verglichen. Hat der jeweilige Marker beziehungsweise Genort Einfluss auf den Phänotyp bezüglich der untersuchten Erkrankung, treten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Diese Unterschiede werden im sogenannten LOD-Score angegeben. Der LOD-Score ist der Logarithmus des Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Phänotyps, wenn der Genort mit der Erkrankung gekoppelt ist, durch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Phänotyps, wenn keine Kopplung besteht. Je höher die Werte, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass ein Genort mit dem Phänotyp assoziiert ist. Generell spricht man von Kopplung, wenn der LOD-Score größer als 3 ist. Liegt er zwischen 1 und 3, spricht man von möglicher oder suggestiver Kopplung. Mittels der Kopplungsanalyse können also Chromosomenabschnitte identifiziert werden, auf denen Gene liegen, die bei komplexen Erkrankungen eine Rolle spielen.

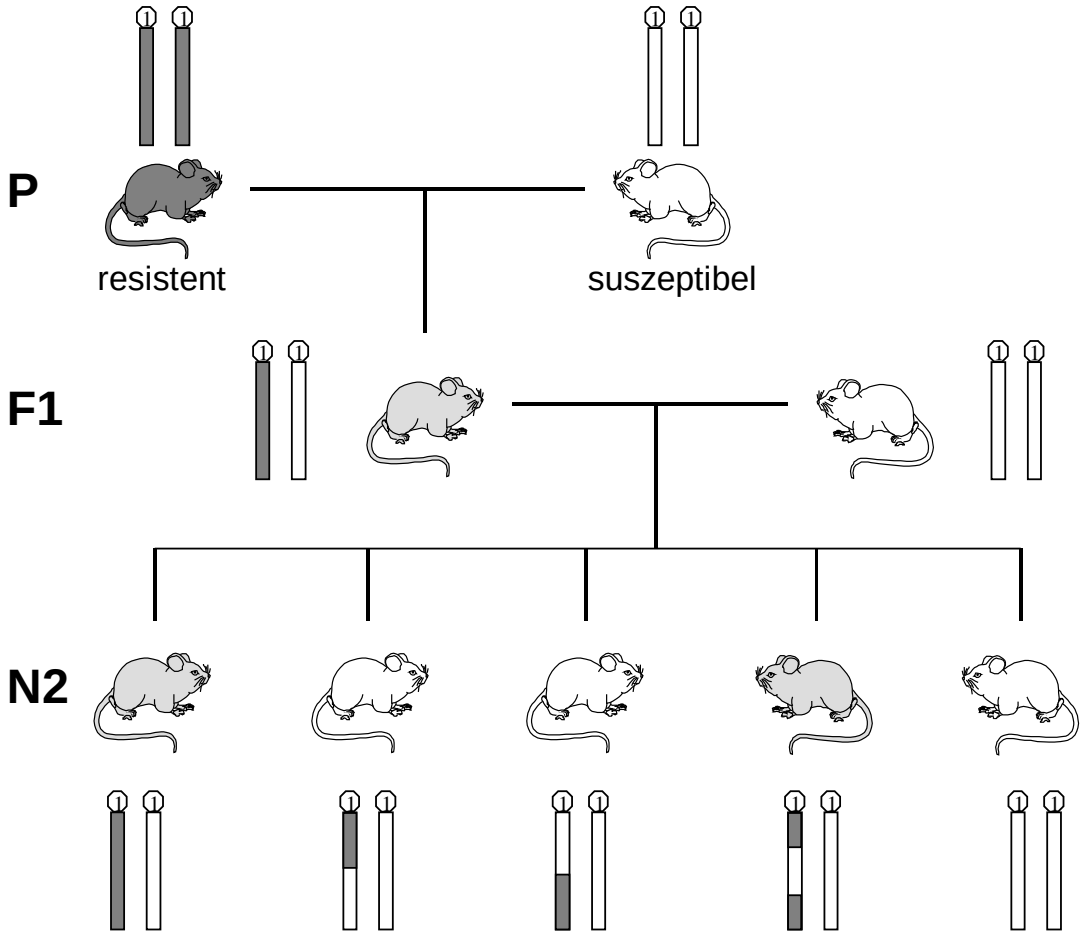


Abb. 5 *Ermittlung von Krankheits-assoziierten Genorten durch Rückkreuzung zwischen zwei Inzucht-Mausstämmen und anschließende Kopplungsanalyse.*
In der Elterngeneration (**P**) werden Mäuse eines für eine untersuchte Erkrankung suszeptiblen Stammes (weiß) mit Tieren eines resistenten Stammes (dunkelgrau) verpaart. Die Nachkommen der **F1**-Generation (hellgrau) werden anschließend mit dem suszeptiblen Elternstamm (weiß) gekreuzt, was zur Erzeugung der **N2**-Generation führt. Die Weitergabe der genetischen Information während der Rückkreuzung ist anhand des Chromosomenpaares 1 dargestellt. Aufgrund von Rekombinationsereignissen in der Meiose der **F1**-Mäuse weisen Mäuse der **N2**-Generation unterschiedliche Chromosomensätze auf und können auf die Kopplung bestimmter Genorte mit dem Phänotyp der Tiere hin untersucht werden. In dieser Kopplungsanalyse wird jeder Marker (A - D) auf den Chromosomen einzeln betrachtet. Alle Mäuse, die beispielsweise für den Marker A homozygot sind, werden in Gruppe 1 zusammengefasst und alle heterozygoten Tiere in Gruppe 2. Anschließend werden die Gruppen 1 und 2 bezüglich der Phänotypen der Mäuse miteinander verglichen.

1.8. Zielsetzung

Die Psoriasis vulgaris ist eine häufige, teilweise entstellende und die Patienten in ihrer Lebensqualität einschränkende Hauterkrankung. Bisherige Therapien verschaffen eine zeitweilige Linderung, eine Heilung ist aber noch nicht möglich. Aufgrund zunehmender Erkenntnisse über die Pathogenese der Psoriasis wurden neue Behandlungsstrategien entwickelt, die die biologische Funktion von T-Zellen hemmen. In klinischen Studien führten diese bereits zu Behandlungserfolgen. Die Pathogenese der Psoriasis muss aber noch weiter geklärt werden, um ein besseres Verständnis der Pathomechanismen zu erlangen und effizientere therapeutische Maßnahmen zu entwickeln. Mit geeigneten Tiermodellen für die Psoriasis könnten Medikamente vor dem Einsatz beim Menschen rasch und kostengünstig untersucht werden. Auch ist eine größere Vielfalt experimenteller Möglichkeiten gegeben, die zur Aufklärung pathogenetischer Vorgänge beitragen können. PL/J-Mäuse mit einer hypomorphen Mutation im CD18-Gen ($CD18^{hypo}$) könnten sich als solches Modell eignen. Sie entwickeln eine psoriasiforme Dermatitis, die der humanen Psoriasis sowohl aufgrund der klinischen und histologischen Merkmale als auch im Ansprechen auf Therapien stark ähnelt.

In der vorliegenden Arbeit sollte das $CD18^{hypo}$ psoriasiforme PL/J-Mausmodell zunächst im Vergleich zur humanen Psoriasis näher charakterisiert werden. Die Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis sollte näher untersucht werden, wobei die Frage im Mittelpunkt stand, welche Rolle die verminderte CD18-Expression auf verschiedenen T-Zellpopulationen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung spielt. Im Gegensatz zu den bisherigen Tiermodellen steht mit der $CD18^{hypo}$ Maus erstmals ein polygenes Mausmodell für Psoriasis zur Verfügung, bei dem zusätzliche, unbekannte Gene bei der Ausprägung des psoriasiformen Phänotyps eine entscheidende Rolle spielen. Durch Rückkreuzung zwischen dem für die Hauterkrankung suszeptiblen PL/J- und dem resistenten C57BL/6J-Stamm und Kopplungsanalysen sollten in dieser Arbeit Chromosomenabschnitte mit Genen identifiziert werden, die zusätzlich zur $CD18^{hypo}$ Mutation für die Manifestation der psoriasiformen Dermatitis verantwortlich sind. Gene, die anhand des Mausmodells ermittelt werden, könnten auch bei der humanen Erkrankung eine Rolle spielen. Daher kann die genetische Analyse der $CD18^{hypo}$ Mäuse auf lange Sicht zur Aufklärung der Pathogenese der Psoriasis des Menschen beitragen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

- Akku-Haarschneidemaschine (Eickemeyer, Tuttlingen)
- CO_2-Inkubator von Heraeus (Kendro Laboratory Products, Hanau)
- Durchflusszytometer FACSCalibur® (BD Biosciences, Heidelberg)
- ELISA-Messgerät LP400 (Sanofi Diagnostics Pasteur, Chaska, MN, USA)
- Entwicklermaschine Curix 60 (Agfa, Köln)
- Geldokumentationssystem (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Gelkammer Horizon 11.14 (Gibco BRL Life Technologies™, Gaithersburg, MD, USA)
- Gelkammer GNA 200 (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Gene Power Supply GPS 200/400 (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Hybridisierungsofen (Biometra, Göttingen)
- Hybridisierungsröhre (Stuart Scientific, Watford Herts, Großbritannien)
- Kamera Dental-Eye II (Yashica, Hamburg)
- Kassette mit Bleieinlage (Konica, Hohenbrunn)
- Kontaminationsmonitor LB122 (Laboratorium Prof. Dr. Berthold, Bad Wildbad)
- Kryostat Cryocut 1800 (Leica, Bensheim)
- Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar)
- Magnetrührer IKAMAG®REO (IKA Labortechnik, Staufen)
- Megafuge 1.0 von Heraeus (Kendro Laboratory Products, Hanau)
- Mikrometerschraube (The Dyer Company, Lancaster, PA, USA)
- MiniMACS®-Magneten (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- PCR-Maschine PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA)
- Pipettboy (Integra Biosciences, Chur, Schweiz)
- Pipetten 1000, 100, 10 µl (Eppendorf AG, Hamburg)
- Schüttler IKA-Vibrax-VXR (IKA Labortechnik, Staufen)
- Sterilwerkbank von Heraeus (Kendro Laboratory Products, Hanau)
- Thermomixer Compact (Eppendorf AG, Hamburg)
- Tisch-Zentrifuge 5417C (Eppendorf AG, Hamburg)

- Transilluminator TI 1 (Biometra, Göttingen)
- UV-Spektrometer Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Vortexer Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)
- Wasserbad SW21 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)
- Zentrifuge GS-6 (Beckman Coulter, Krefeld)
- β-Zerfallszähler (Beckman Coulter, Krefeld)

2.1.2. Verbrauchsmaterial

- 96-Loch-Platten (Nunc, Wiesbaden)
- Biopsiestanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main)
- DakoCytomation Pen (DAKO, Glostrup, Dänemark)
- Deckgläschen (Menzel-Glaeser, Braunschweig)
- Einmalspritzen und Kanülen (Terumo, Leuven, Belgien)
- Farbdiafilm Elite Chrome 200, 35mm (Kodak, Rochester, NY, USA)
- Glaspasteurpipetten Volac (Poulten & Graf, Wertheim)
- Hybond N+ Membranen (Amersham Biosciences, Freiburg)
- MiniMACS®-Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Objektträger (Menzel-Glaeser, Braunschweig)
- Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht)
- Plastikpipetten (BD Biosciences, Heidelberg)
- Reaktionsgefäße 0,5, 1,5, 2,0 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
- Reaktionsgefäße 15, 50 ml (BD Biosciences, Heidelberg)
- Röntgen-Filme X-OMAT™ AR (Kodak, Rochester, NY, USA)
- Rundbodenröhrchen (BD Biosciences, Heidelberg)
- Sephadex-G50-Säule „Quick Spin Columns“ (Roche, Mannheim)
- Whatmanpapier (Schleicher&Schuell, Dassel)
- Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg)

2.1.3. Chemikalien, Seren und Medien

Alle Chemikalien hatten mindestens die Reinheitsstufe „p.a.“.
- Aceton (Roth, Karlsruhe)
- 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (Merck, Darmstadt)

- Ammoniumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Roche, Mannheim)
- Borsäure (AppliChem, Darmstadt)
- Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)
- Chloroform (J.T. Baker, Deventer, Holland)
- Ciprobay® 2000 (Bayer, Leverkusen)
- Dextransulfat (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Dimethylformamid (Merck, Darmstadt)
- Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande)
- Eindeckmedium DAKO® Faramount (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA)
- Essigsäure (Merck, Darmstadt)
- Ethanol Riedel-de Haën® (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 4-Ethoxymethylen-2-Phenyl-2-Oxazolin-5-On (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Ethylendiamintetraessigsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Ficoll 400 (Merck, Darmstadt)
- Fetales Kälberserum (PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich)
- Formaldehyd (Merck, Darmstadt)
- Hämatoxylin „Mayers Hämalaun-Färbelösung“ (Merck, Darmstadt)
- Heparin Liquemin® N 25000 (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen)
- Ionomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Isoamylalkohol (Merck, Darmstadt)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt)
- Kaninchen-Normalserum (DAKO, Glostrup, Dänemark)
- Kaliumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt)
- Ketamin Ketanest® (Parker-Davis, Berlin)
- Milchpulver Glücksklee (Nestlé, Frankfurt am Main)
- Natriumacetat (Merck, Darmstadt)
- Natriumcitrat (Merck, Darmstadt)
- Natriumchlorid (AppliChem, Darmstadt)
- Natriumdihydrogenphosphat (J.T. Baker, Deventer, Holland)
- Natriumdodecylsulfat (Merck, Darmstadt)

- Natriumhydroxid-Plätzchen (AppliChem, Darmstadt)
- Natriumazid (Merck, Darmstadt)
- Olivenöl (Apotheke der Medizinischen Einrichtungen der Universität zu Köln, Köln)
- Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
- Perjodsäure (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Roti®-Phenol/Chloroform (Roth, Karlsruhe)
- Phorbol-12-myristat-13-acetat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Rinderserum-Albumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- RPMI 1640 Medium (Life Technologies, Paisley, Scotland)
- Salzsäure (J.T. Baker, Deventer, Holland)
- Saponin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- SeaKem® LE Agarose (FMC Bioproducts, Rocklands, Maine, USA)
- Spermidin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Wasserstoffperoxid Perhydrol® (Merck, Darmstadt)
- Xylazin Rompun® (Bayer, Leverkusen)
- Xylencyanol FF (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

2.1.4. Puffer

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Puffer mit bidestilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder sterilisiert.

- Acetatpuffer (0,5 % [v/v] Essigsäure, 0,15 M Natriumacetat)
- ACK-Lysepuffer (0,15 M Ammoniumchlorid, 1,0 M Kaliumhydrogencarbonat, 0,1 M EDTA, pH 7,2)
- CellWash (BD Biosciences, Heidelberg)
- DNA-Probenpuffer (TBE, 20 % [v/v] Ficoll 400, 0,125 % [w/v] Bromphenolblau, 0,125 % [w/v] Xylencyanol FF)
- Hybridisierungs-Lösung (1,5 x SSPE, 0,5 % [w/v] Milchpulver, 1 % [w/v] SDS, 10 % [w/v] Dextransulfat, 0,3 mg/ml ssDNA)
- Lyse-Puffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM Natriumchlorid, 5 mM DTT, 0,5 mM Spermidin, 2 % [w/v] SDS, 200 µg Proteinase K)
- MACS-Puffer (PBS, 5 mM EDTA, 0,5 % [w/v] BSA, entgast im UV-Bad)
- PBS (Biochrom KG, Berlin)

- 20 x SSC (3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat [pH 7,0])
- 20 x SSPE (3 M Natriumchlorid, 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat, 20 mM EDTA [pH 7,4])
- TBE (50 mM Tris, 50 mM Borsäure, 1 mM EDTA [pH 8,5])
- TBS (50 mM Tris, 15 mM Natriumchlorid [pH 8,0])
- TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA [pH 8,0])

2.1.5. Antikörper

Monoklonale Antkörper (mAk) waren entweder unkonjugiert oder gekoppelt an einen der folgenden Fluoreszenzfarbstoffe: APC = Allophycocyanin (670 nm), CyChrome = Konjugat aus Phycoerythrin und Indodicarbocyanin (760 nm), FITC = Fluorescein-Isothiocyanat (525 nm), PE = Phycoerythrin (575 nm), PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein (670 nm). In Klammern ist die jeweilige Emissionswellenlänge angegeben.
Die für die T-Zell-Depletion verwendeten mAk enthielten keine Säuren und nur wenig Endotoxin (NA/LE). Hinter der Spezifität der folgenden mAk ist in Klammern der Name des Klons angegeben.
Für die immunhistochemische Analyse wurden als sekundäre Antikörper ein Peroxidase-gekoppelter Ziege anti-Ratte IgG Ak (SBA, Birmingham, AL, USA) und ein biotinylierter Kaninchen anti-Ratte Ig Ak (DAKO, Glostrup, Dänemark) verwendet. Maus (m)CD90 MACS Beads (Thy-1.2) stammten von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach). Der Maus Pan-Makrophagen mAk (BM 8) war von Dianova (Hamburg).
Alle weiteren mAk stammten von BD Biosciences (Heidelberg):
mCD3 (17A2), mCD4 (GK1.5, NA/LE), mCD8a (53-6.7, NA/LE), mCD28 (37.51), mCD31 (390), mIgG2a (R35-95, NA/LE), mIgG2b (A95-1, NA/LE), mCD3 CyChrome (145-2C11), mCD4 PE (H129.19), mCD4 PerCP (RM4-5), mCD8b.2 PE (53-5.8), mCD11a FITC (M17/4), mCD11b APC (M1/70), mCD11c APC (HL3), mCD18 PE (C71/16), mCD25 FITC (7D4), Ratte (r)IgG2a FITC, PE (RG7/1.30), rIgG2b FITC, APC (RG7/11.1), Hamster IgG, Gruppe 1 APC (A19-3), IL-2 PE (JES6-5H4), IL-4 PE (11B11), IL-6 PE (MP5-20F3), IL-10 PE (JES5-16E3), IL-12 PE (C15.6) und IFN-γ PE (XMG 1.2).

2.1.6. Enzyme

- Proteinase K (Roche, Mannheim)

- Restriktionsendonukleasen Hind III (Hybaid-AGS, Heidelberg) und Kpn I (Roche, Mannheim)
- RNase A (Qiagen, Hilden)
- Taq-DNA-Polymerase (Amersham Biosciences, Freiburg)

2.1.7. Nukleotide

- [α-^{32}P]dCTP (ICN, Eschwege)
- dNTPs (Roche, Mannheim)
- Lachssperma-DNA (ssDNA; Amresco, Solon, OH, USA)
- Oligonukleotide (Primer) für die CD18-PCR (MWG-Biotech AG, Ebersberg)

  Primer I: 5′-AGG ACA GCA AGG GGG AGG ATT-3’

  Primer II: 5′-GCC CAC ACT CAC TGC TGC TTG-3’

  Primer III: 5′-CCC GGC AAC TGC TGA CTT TGT-3’

2.1.8. Materialien für die Mikrosatellitenanalyse

- Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt)
- Inkubator (Memmert, Schwabach)
- MegaBACE^{1000} DNA Analysis System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
- MegaBACE^{TM} ET400-R Größenstandard (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
- MegaBACE^{TM} Long Read Matrix (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
- 10 x MegaBACE^{TM} LPA Puffer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
- MegaBACE-Platten Thermo-Fast$^{®}$96 (ABgene House, Epsom, Surrey, Großbritannien)
- Multifuge 3 S-R von Heraeus (Kendro Laboratory Products, Hanau)
- dNTP Set (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
- Oligonukleotide (MWG-Biotech AG, Ebersberg und Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire, Großbritannien)
- PCR-Maschinen PTC-100 und PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)
- PCR-Platten Thermo-Fast$^{®}$96 (ABgene House, Epsom, Surrey, Großbritannien)
- 10 x PCR-Puffer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
- Taq DNA-Polymerase (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
- Tisch-Zentrifuge MicroMax (International Equipment Company, Needham HTS., MA, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Mäuse

2.2.1.1. Mäuse mit unterschiedlichen Mutationen

Mäuse mit einer hypomorphen Mutation im CD18-Gen (Abb. 2) auf dem Hintergrund des PL/J-Inzuchtstammes wurden untersucht (Bullard et al. 1996). Zusätzlich wurden Mäuse mit einer CD18-Nullmutation ($CD18^{null}$) (Scharffetter-Kochanek et al. 1998), die sieben Generationen auf den PL/J-Stamm rückgekreuzt waren, eingesetzt. Obwohl diese beiden Stämme keine PL/J-Inzuchtstämme darstellten, werden sie im folgenden als PL/J-Stämme bezeichnet. $CD18^{+/+}$ Geschwister ($CD18^{wt}$), die aus Verpaarungen von heterozygoten Mäusen hervorgingen, dienten als Wildtypkontrollen. Falls nicht anders vermerkt, zeigten alle $CD18^{hypo}$ Mäuse einen starken psoriasiformen Phänotyp. Wildtyp PL/J-, sowie $CD18^{hypo}$ und Wildtyp C57BL/6J-Mäuse stammten von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Alle Mäuse wurden unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen gehalten und ab einem Alter von sechs Wochen für Experimente eingesetzt. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Tierversuchsgenehmigung vom 23.08.2000 trug das Aktenzeichen 50.203.2 K 37a, 24/00.

2.2.1.2. Mauszucht

2.2.1.2.1. Allgemeines

Zur Zucht wurde jeweils ein Männchen (♂) mit einem oder zwei Weibchen (♀) verpaart. Zur Zucht der $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäuse wurden meist Tiere verwendet, die einen noch schwachen psoriasiformen Phänotyp zeigten, da stärker betroffene Mäuse sich kaum fortpflanzten. Nachkommen wurden 21 Tage nach der Geburt von ihren Eltern getrennt (abgesetzt). Von da an wurden sie, nach Geschlecht getrennt, in Absatzkäfigen mit bis zu fünf (Typ II Käfige) beziehungsweise acht Tieren (Typ III Käfige) gehalten. Nach weiteren drei Wochen erreichten die Jungtiere ihre Geschlechtsreife und konnten ihrerseits zur Zucht oder für Experimente eingesetzt werden.
Um Mäuse individuell identifizieren zu können, wurden sie durch das Stanzen von Ohrlöchern markiert.

2.2.1.2.2. Rückkreuzung zwischen CD18^{hypo} PL/J- und C57BL/6J-Mäusen

Es wurde eine Rückkreuzung zwischen CD18^{hypo} Mäusen des für die psoriasiforme Dermatitis suszeptiblen PL/J-Stammes und des resistenten C57BL/6J-Stammes analog Abb. 5 durchgeführt. Da bei den Mäusen der F1-Generation keine Erkrankung auftrat, wurde auf den suszeptiblen PL/J-Stamm rückgekreuzt. Hierzu wurden insgesamt sechs Männchen (♂) des PL/J-Stammes mit einem schwachen psoriasiformen Phänotyp, acht Weibchen (♀) des C57BL/6J-Stammes und 26 ♀ der F1-Generation eingesetzt. Eine detaillierte Darstellung findet sich in Anhang 1.

2.2.1.3. Beurteilung des Phänotyps von CD18^{hypo} Mäusen

2.2.1.3.1. Phänotypisierung der Nachkommen aus der Rückkreuzung

Die Nachkommen der N2-Generation, die aus der unter 2.2.1.2.2. beschriebenen Rückkreuzung hervorgegangen waren, wurden mittels des folgenden Beurteilungssystems alle zwei Wochen über einen Zeitraum von bis zu 20 Monaten auf ihren psoriasiformen Phänotyp hin untersucht: 0 = keine Symptome; 1 = Erythem der Ohren, Schuppung des Schwanzes; 2 = Haarverlust zusätzlich zu den unter 1 genannten Symptomen; 3 = Haarverlust und vereinzelte oder ausgedehnte leichte Schuppung; 4 = gemäßigte Schuppung auf einem großen Bereich des Körpers oder starke Schuppung auf wenigen, kleineren oder auch großen Bereichen. In Anlehnung an den PASI-Score („Psoriasis Activity and Severity Index“; Fredriksson und Pettersson 1978), der routinemäßig für die Bestimmung des Schweregrades bei der humanen Psoriasis verwendet wird, wurde dieses Beurteilungssystem als adaptierter PASI-Score bezeichnet.
Für jede Maus wurden folgende Phänotypen ermittelt, die für die Kopplungsanalyse herangezogen wurden:

Phänotyp	Beschreibung	Werte
Maxscore	Höchster adaptierter PASI-Score, der für die Maus beobachtet wurde	0 - 4
Onset	Zeit (in Wochen) nach dem Absetzen, zu der die ersten Zeichen der Erkrankung auftraten	0 - 75
Susceptibility	Suszeptibel für die Erkrankung oder nicht	1 oder 0

Sex	Geschlecht (Männchen oder Weibchen)	M oder W
AUC34	Summe der adaptierten PASI-Scores, die nach dem Absetzen alle zwei Wochen bis zu 34 Wochen bestimmt wurden (= Area Under Curve)	0 - 72

2.2.1.3.2. Erweiterter adaptierter PASI-Score zur Beurteilung von Therapieerfolgen

Um den Schweregrad der psoriasiformen Hauterkrankung bei $CD18^{hypo}$ Mäusen, die mit T-Zell-depletierenden mAk behandelt wurden (siehe 2.2.4.), detaillierter ermitteln zu können, wurde der adaptierte PASI-Score folgendermaßen erweitert: 0 = keine Symptome; 1 = leichtes Erythem der Ohren; 2 = starkes Erythem der Ohren; 3 = geringer Haarverlust im Bereich des Kopfes; 4 = ausgedehnter Haarverlust auch am Körper; 5 = geringer Haarverlust, vereinzelt Schuppung; 6 = ausgedehnter Haarverlust, vereinzelt Schuppung; 7 = ausgedehnter Haarverlust, ausgedehnte leichte Schuppung; 8 = gemäßigte Schuppung auf ausgedehnten Körperregionen; 9 = ausgedehnter Haarverlust, starke Schuppung auf wenigen, kleineren Körperregionen; 10 = ausgedehnter Haarverlust, starke Schuppung auf ausgedehnten Körperregionen.

2.2.2. Genotypisierung der Mäuse

Nach dem Absetzen der Jungtiere wurde diesen unter Verwendung einer scharfen Schere die äußerste Schwanzspitze (etwa 5 mm Länge) amputiert. Aus den Schwanzspitzen wurde die DNA isoliert und analysiert, um in der Zucht den Genotyp der Tiere in Bezug auf die mutierten Gene zu überprüfen. Diese Genotypisierung erfolgte entweder durch eine RFLP-Analyse oder durch eine PCR-Analyse, letztere für $CD18^{hypo}$ Mäuse in Kombination mit einer FACS-Analyse.

2.2.2.1. Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien (Proteinase K-Verdau)

Mausschwanz-Biopsien wurden über Nacht bei 55°C mit 500 µl Lyse-Puffer unter Schütteln inkubiert. Die unlöslichen Reste wurden durch Zentrifugation (8 min bei 14.000 rpm) sedimentiert und der Überstand mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Nach Mischen und Zentrifugation (5 min bei 14.000 rpm) wurde die wässrige Phase mit der gleichen Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach

Zentrifugation (5 min bei 14.000 rpm) wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit dem gleichen Volumen Isopropanol (mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes) präzipitiert, in 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen der DNA in 30 µl TE-Puffer resuspendiert. Zum vollständigen Lösen der DNA wurde mehrere Stunden bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA mit einem UV-Spektrometer gemessen. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.
In den Fällen, in denen ein geringerer Reinheitsgrad ausreichend war (PCR-Analyse, RFLP-Analyse für die $CD18^{null}$ Mutation), wurde die DNA direkt aus dem Überstand mit dem doppelten Volumen Ethanol präzipitiert, in 70 % Ethanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Zum vollständigen Lösen der DNA wurde mehrere Stunden bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.2.2.2. Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Bei der RFLP-Analyse erfolgte zunächst eine Spaltung der DNA mit einem Restriktionsenzym. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem Agarosegel wurden sie auf eine Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die Länge eines bestimmten Fragments konnte durch Hybridisierung mit einer spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonde ermittelt werden.

2.2.2.2.1. Restriktionsspaltung

10 µg DNA wurde je nach Genotyp in einem der unten angegebenen Reaktionsgemische mit dem jeweiligen Restriktionsenzym über Nacht bei 37°C inkubiert.

$CD18^{hypo}$

x	µl	DNA (= 10 µg)
0,5	µl	Spermidin (100 mM)
0,5	µl	BSA (1 mg/ml)
5	µl	10 x Puffer
1	µl	RNase A (2.5 mg/ml)
42-x	µl	H_2O
1	µl	Kpn I (40 U/µl)
50	µl	Zunächst Inkubation für 4 h bei 37°C, anschließend Zugabe von 1 µl Kpn I und Inkubation über Nacht bei 37°C.

CD18^{null}

x	µl	DNA (= 10 µg)	
5	µl	10 x Puffer	
1	µl	DTT (50 mM)	
40-x	µl	H_2O	
4	µl	Hind III (20 U/µl)	
50	µl		Inkubation über Nacht bei 37°C.

2.2.2.2.2. Gelelektrophorese

Die geschnittene DNA wurde mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in horizontalen 0,8 %-igen Agarosegelen mit TBE als Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Die DNA wurde durch Zugabe einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung auf eine Endkonzentration von etwa 0,5 µg/ml zur verflüssigten Agarose angefärbt. Als Größenstandard diente der Marker II von Roche (Mannheim).

2.2.2.2.3. Transfer von DNA auf Nitrozellulose

Nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen wurde die DNA mit Hilfe des Southern Blots (Southern 1975) auf Hybond N+ Nitrozellulose-Membranen transferiert. Das Gel wurde zunächst 15 min in 250 mM Salzsäure-Lösung geschwenkt, einige Male mit Wasser gespült und dann weitere 15 min in 0,4 M Natriumhydroxid geschwenkt. Der Transfer auf die Membran erfolgte über Nacht durch die Kapillarwirkung von Whatmanpapier und Papiertüchern mit 0,4 M Natriumhydroxid. Die Membran wurde anschließend in 2 x SSPE-Lösung gespült und bis zum Hybridisieren in Frischhaltefolie eingewickelt bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.2.4. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung von doppelsträngiger DNA wurde das “Megaprime DNA Labelling System” von Amersham Biosciences (Freiburg) benutzt, das auf dem Prinzip des Random Priming basiert (Feinberg und Vogelstein 1983). In der Regel wurden 25 ng DNA eingesetzt und durch die Zugabe von 1,85 Mbq [α-^{32}P]dCTP (spezifische Aktivität > 111 TBq/mmol) nach dem unten angegebenen Protokoll markiert. Zur Abtrennung der nicht

eingebauten Nukleotide wurde die markierte DNA über eine Sephadex-G50-Säule nach Herstellerangaben aufgereinigt. Ein Aliquot des Eluats wurde im β-Zerfallszähler gemessen.

x	µl	DNA (= 25 ng)
5	µl	Primer-Lösung
28-x	µl	H_2O

Dieses Gemisch wurde zunächst 5 min bei 95°C inkubiert, dann jeweils hinzugegeben:

10	µl	"Labelling"-Puffer
5	µl	[α-^{32}P]dCTP
2	µl	Klenow-Fragment (1 U/µl)
50	µl	

Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 40 µl TE-Puffer hinzugefügt.

2.2.2.2.5. Hybridisierung mit DNA-Sonden

Die zu hybridisierenden Membranen wurden zunächst in 15 ml Hybridisierungs-Lösung bei 65°C für mindestens 1 h vorhybridisiert. Im Anschluss wurde die denaturierte markierte Sonde zugegeben und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Am folgenden Tag wurde je nach Genotyp nach den unten angegebenen Protokollen gewaschen. Auf den Membranen wurden Röntgen-Filme bei –80°C in Kassetten mit Bleieinlage exponiert. Die Signale wurden durch Verstärkungsfolien intensiviert.

CD18^{hypo}			**CD18^{null}**		
2x 20 min	2 x SSC / 0,1 % SDS	RT	1x 20 min	2 x SSC / 0,1 % SDS	65°C
2x 15 min	0,1 x SSC / 0,1 % SDS	RT	1x 15 min	0,1 x SSC / 0,1 % SDS	65°C
1x 10 min	0,1 x SSC / 0,1 % SDS	50°C	1x 5 min	0,1 x SSC / 0,1 % SDS	65°C

Der letzte Schritt wurde jeweils nur durchgeführt, wenn die Hintergrundstrahlung noch zu stark war.

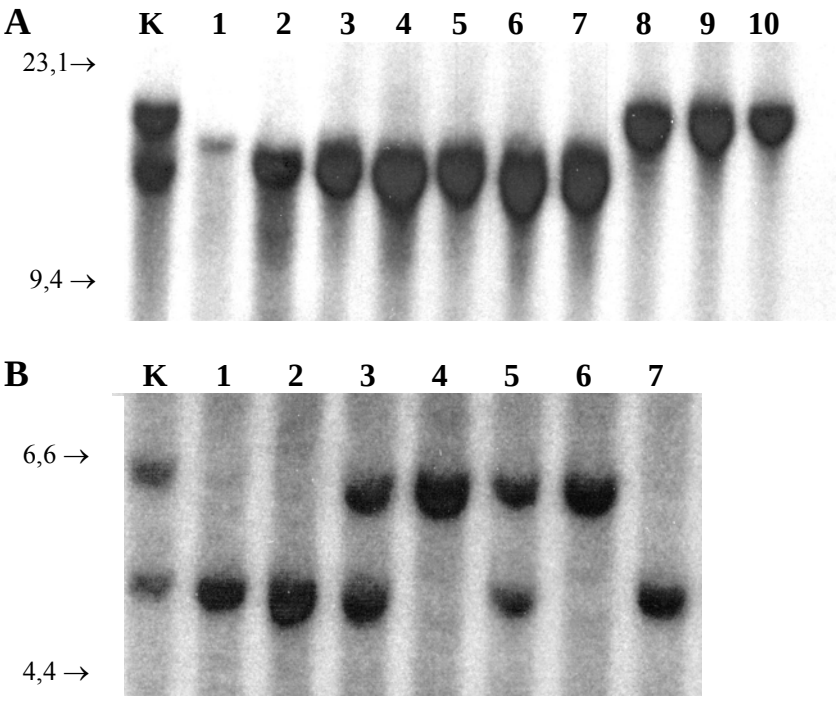


Abb. 6 *RFLP-Analyse zum Nachweis von Mutationen im CD18-Gen.*
(*A*) Nach Verdau der genomischen DNA mit dem Restriktionsenzym Kpn I wiesen $CD18^{hypo}$ Mäuse ein Fragment der Länge 15 kb auf (Mäuse 1 - 7), während $CD18^{+/+}$ Tiere ($CD18^{wt}$) ein Fragment der Länge 20 kb zeigten (Mäuse 8 - 10). Als Positivkontrolle (K) wurde DNA von Mäusen eingesetzt, die heterozygot für die CD18-Mutation waren. Da für die Maus 1 deutlich weniger DNA eingesetzt wurde, lag die Bande für das 15 kb-Fragment höher als bei den anderen Tieren. Die 23,1 kb- und 9,4 kb-Banden des Markers sind auf der linken Seite markiert. (*B*) Zum Nachweis der CD18 Nullmutation wurde DNA von Mäusen mit dem Restriktionsenzym Hind III geschnitten. Für $CD18^{null}$ Mäuse trat ein Fragment der Länge 6,5 kb auf (Mäuse 4 und 6), während $CD18^{wt}$ Tiere ein Fragment der Länge 5 kb trugen (Mäuse 1, 2 und 7). Heterozygote Tiere ($CD18^{null/wt}$) wiesen beide Fragmente auf (Mäuse 3 und 5). Als Positivkontrolle (K) wurde DNA von Mäusen eingesetzt, die heterozygot für die CD18-Mutation waren. Die 6,6 kb- und 4,4 kb-Banden des Markers sind auf der linken Seite markiert.

2.2.2.2.6. Bestimmung des Genotyps

Zum Nachweis der CD18 hypomorphen Mutation ergab sich nach Schneiden von genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym Kpn I und Hybridisierung mit der Sonde „FP“ für $CD18^{hypo}$ Mäuse ein Fragment der Länge 15 kb (Abb. 4*C*), während $CD18^{+/+}$ Mäuse ($CD18^{wt}$), die das CD18-Wildtypgen trugen, durch ein Fragment der Länge 20 kb identifiziert werden konnten (Abb. 4*A*). Heterozygote Tiere ($CD18^{hypo/wt}$) wiesen beide Fragmente auf. Ein Beispiel für ein Ergebnis einer solchen RFLP-Analyse ist in Abb. 6*A* dargestellt. Die Mäuse 1 - 7 sind $CD18^{hypo}$, während die Tiere 8 - 10 $CD18^{wt}$ sind. Da für die Maus 1 deutlich weniger DNA eingesetzt wurde, lag die Bande für das 15 kb-Fragment höher als bei den anderen Tieren.

Zum Nachweis der CD18-Nullmutation wurde, wie zuvor beschrieben, DNA von Mäusen mit dem Restriktionsenzym Hind III geschnitten und anschließend mit der Sonde auf der 3´-Seite des Exons 3 (Abb. 3) hybridisiert. $CD18^{null}$ Mäuse waren durch ein Fragment der Länge 6,5 kb gekennzeichnet (Abb. 3*C*), während $CD18^{wt}$ Tiere ein Fragment der Länge 5 kb trugen (Abb. 3*A*). Heterozygote Tiere ($CD18^{null/wt}$) wiesen beide Fragmente auf. Ein Beispiel für ein Ergebnis einer solchen RFLP-Analyse ist in Abb. 6*B* dargestellt. Die Mäuse 4 und 6 sind $CD18^{null}$, die Mäuse 1, 2 und 7 $CD18^{wt}$ und die Mäuse 3 und 5 $CD18^{null/wt}$.

2.2.2.3. Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

2.2.2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde ein DNA-Fragment vervielfältigt, das zwischen zwei Oligonukleotiden (Primern) lag, die sich spezifisch an eine DNA-Sequenz anlagern. Primer I lag in 5´→3´-Richtung (Forward-Primer) in der eingebrachten Neomycin-Kassette (Abb. 2 und 3), Primer II in gleicher Orientierung im Exon 2 des CD18-Gens und Primer III in 3´→5´-Richtung (Reverse-Primer) in Exon 3. Für die PCR wurde folgender Ansatz etabliert:

5	µl	DNA (= 100 ng)
0,2	µl	Primer I (100 µM) oder Primer II (100 µM)
0,2	µl	Primer III (100 µM)
5	µl	10 x Puffer
1	µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
38,5	µl	H_2O
0,1	µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
50	µl	

Als Positivkontrolle (K) wurde DNA von Mäusen eingesetzt, die heterozygot für die CD18-Mutation waren. Als Negativkontrolle wurde H_2O anstelle von DNA verwendet.
Das Programm startete mit einem fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 94°C, auf den die angegebenen Programmzyklen folgten. Nach den Zyklen wurden die Ansätze bis zur Analyse auf 4°C gekühlt.

initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	1 min	
Anlagerung	58°C	1 min	30x
Kettenverlängerung	72°C	1 min	
letzte Kettenverlängerung	72°C	7 min	

2.2.2.3.2. Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in horizontalen 2 %-igen Agarosegelen mit TBE als Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Die DNA wurde durch Zugabe einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung auf eine Endkonzentration von etwa 0,5 µg/ml zur verflüssigten Agarose angefärbt. Als Größenstandard diente die 1 kb+ DNA-Leiter von Invitrogen (Karlsruhe).

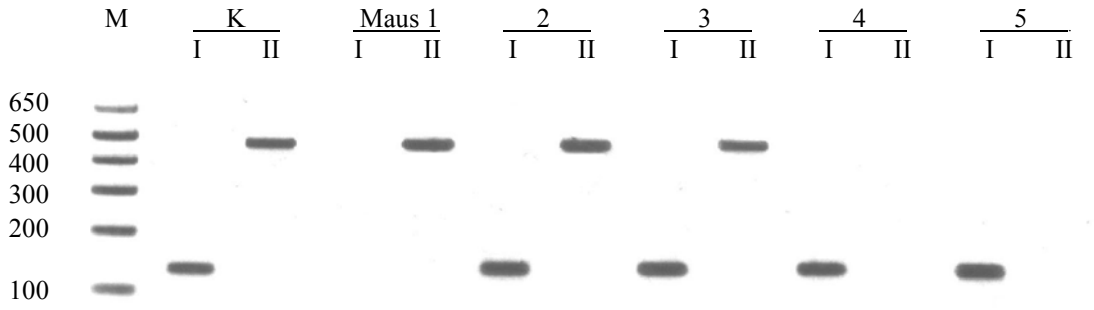


Abb. 7 *PCR-Analyse zum Nachweis der Nullmutation im CD18-Gen.*
Für die einzelnen Mäuse wurde jeweils eine PCR mit der Primerkombination I + III (I) und der Primerkombination II + III (II) durchgeführt. Für heterozygote Tiere ($CD18^{null/wt}$) trat unter II das Wildtyp-Allel mit einer Länge von 467 bp auf und unter I das 140 bp lange Allel der CD18-Mutation (Mäuse 2 und 3). $CD18^{wt}$ Mäuse zeigten nur das 467 bp-Produkt mit der Primerkombination II (Maus 1), während $CD18^{null}$ Mäuse lediglich das 140 bp-Produkt mit der Primerkombination I aufwiesen (Mäuse 4 und 5). Als Positivkontrolle (K) wurde DNA von Mäusen eingesetzt, die heterozygot für die hypomorphe CD18-Mutation waren. Die Banden des Markers sind auf der linken Seite zu sehen.

2.2.2.3.3. Ergebnis der Genotypisierung mittels PCR

Eine Kombination der Primer II + III ergab das Wildtyp-Allel mit einer Länge von 467 bp. Mit der Primerkombination I + III wurde das 140 bp lange Allel der CD18-Mutation amplifiziert. Da das eingebrachte Konstrukt für $CD18^{hypo}$ und $CD18^{null}$ identisch war, konnten die Primer in beiden Fällen angewandt werden. Ein Beispiel für das Ergebnis einer solchen

PCR-Analyse ist in Abb. 7 dargestellt. Die Mäuse 4 und 5 sind $CD18^{null}$, die Mäuse 2 und 3 $CD18^{null/wt}$ und die Maus 1 $CD18^{wt}$.

Für Tiere, die die CD18 hypomorphe Mutation trugen, ließ sich allerdings nicht ermitteln, ob die Mutation homozygot oder heterozygot vorlag. Auch bei Homozygotie trat das Wildtyp-Fragment auf, da die Mutation durch Duplikation eingebracht wurde und somit auch die Wildtyp-Sequenz noch vorhanden war (vergleiche Abb. 4*C*). Mittels PCR ließen sich also nur $CD18^{wt}$ Mäuse eindeutig identifizieren.

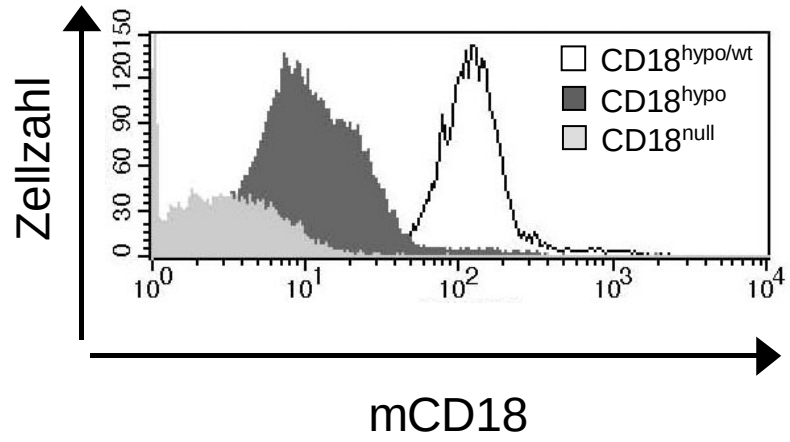


Abb. 8 *$CD18^{hypo}$ und $CD18^{null}$ Mäuse lassen sich aufgrund verminderter oder fehlender CD18-Expression auf PBMC von $CD18^{hypo/wt}$ Mäusen unterscheiden.*
Das Ergebnis der FACS-Analyse des peripheren Blutes der jeweiligen Tiere ist als Histogramm dargestellt, welches die mittlere Fluoreszenzintensität für den verwendeten mCD18 mAk (X-Achse) und die Zellzahl (Y-Achse) angibt. Die Abnahme der CD18-Expression von $CD18^{hypo/wt}$ (weiße Fläche) über $CD18^{hypo}$ (dunkelgraue Fläche) zu $CD18^{null}$ Mäusen (hellgraue Fläche) ist klar zu erkennen. Die mittlere Fluoreszenzintensität von $CD18^{wt}$ Mäusen entspricht der von $CD18^{hypo/wt}$ Tieren und ist daher hier nicht dargestellt. Für PBMC aus der Milz ist sie in Abb. 9*A* im Vergleich zu $CD18^{hypo}$ Mäusen gezeigt.

2.2.2.4. Bestimmung der CD18-Expression mittels FACS-Analyse

Für die CD18 hypomorphe Mutation wurde zusätzlich zur PCR-Analyse eine FACS-Analyse (siehe 2.2.6.1.) durchgeführt, bei der die CD18-Expression auf Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bestimmt wurde. Hierbei wiesen homozygote $CD18^{hypo}$ Mäuse (Abb. 8, dunkelgraue Fläche) im Vergleich zu heterozygoten $CD18^{hypo/wt}$ (Abb. 8, weiße Fläche) und $CD18^{wt}$ Tieren eine 10-fach verminderte CD18-Menge auf.

In der PCR ließen sich $CD18^{wt}$ Mäuse von $CD18^{hypo/wt}$ und $CD18^{hypo}$ Tieren und in der FACS-Analyse $CD18^{hypo}$ Mäuse von $CD18^{hypo/wt}$ und $CD18^{wt}$ Tieren unterscheiden. Durch die Kombination beider Methoden konnte der Genotyp der Mäuse bezüglich der CD18 hypo-

morphen Mutation eindeutig bestimmt werden. Auch homozygote $CD18^{null}$ Mäuse ließen sich aufgrund des Fehlens von CD18 mittels FACS identifizieren (Abb. 8, hellgraue Fläche).

2.2.3. Immunhistochemische Analyse

Um immunologisch reaktive Strukturen in Geweben nachweisen zu können, wurden Antikörper eingesetzt, die die jeweiligen Antigene spezifisch erkannten. Diese primären Antikörper wiederum wurden mittels für sie spezifischer sekundärer Antikörper detektiert. Die Detektion erfolgte entweder durch Peroxidase oder Alkalische Phosphatase.

2.2.3.1. Peroxidase-Detektionssystem

Gefrierschnitte (4 - 6 µm) von Geweben, die in Tissue-Tek® O.C.T. Compound eingebettet waren, wurden auf Polylysin-beschichtete Objektträger gebracht und mittels eines indirekten Immunperoxidase-Assays immunhistochemisch gefärbt. Hierzu wurde nach Fixieren in Aceton (2 min) die endogene Peroxidase-Aktivität durch 1 % Natriumazid / 0,035 % Wasserstoffperoxid gehemmt (20 min). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 10 % FCS in PBS blockiert (30 min). Der jeweilige primäre Ratte-anti-Maus mAk wurde für 60 min in feuchter Atmosphäre auf die Schnitte gegeben und anschließend zum Erkennen der unbiotinylierten mAk weitere 60 min mit einem präabsorbierten sekundären Ziege anti-Ratte IgG Ak, der mit Peroxidase gekoppelt war, inkubiert. Gewaschen wurde mit PBS. Das Substrat (2 g 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) in 500 ml Dimethylformamid, 1:10 in warmem Acetatpuffer) wurde in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (0,014 %) auf die Schnitte gegeben (3 min). Endogene Peroxidase-Aktivität wurde ein weiteres Mal mit Perjodsäure (0,5 g in 150 ml H_2O) gehemmt (2 min) und die Zellkerne mit Hämatoxylin gefärbt. Zuletzt wurden die Schnitte in DAKO® Faramount eingebettet.

2.2.3.2. Detektionssystem mit Alkalischer Phosphatase

Wenn die Sensitivität des Nachweisverfahrens gesteigert werden musste, wurden die Gefrierschnitte mit Alkalischer Phosphatase gefärbt. Nach Fixieren in Aceton (2 min) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 10 % Kaninchen-Normalserum in TBS abgedeckt (10 min). Der primäre Ratte-anti-Maus mAk wurde für 60 min in feuchter Atmosphäre auf die Schnitte gegeben und anschließend 45 min mit einem biotinylierten sekundären

Kaninchen anti-Ratte Ig Ak inkubiert. Primäre, sekundäre und Isotyp-Kontroll Ak wurden in PBS mit1 % BSA auf eine maximale Konzentration von 1,5 µg IgG/ml verdünnt. Gebundene biotinylierte mAk wurden durch den StreptABComplex/AP-Kit in Kombination mit dem „Fast Red Substrate System“ (beides von DAKO, Glostrup, Dänemark) detektiert. Gegenfärbung und Eindecken wurden wie bei dem Peroxidase-Detektionssystem durchgeführt.

2.2.3.3. Quantifizierung von Zellen

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 400 x durch Zählen der Zellen in der Dermis und Beziehen der Anzahl positiv gefärbter Zellen auf die Gesamtzahl aller Zellen eines Bereich, der durch ein Gitternetz-Okular definiert war. Das Quantifizieren der Zellen in der Epidermis erfolgte durch Bestimmen der Anzahl positiv gefärbter Zellen/cm der Epidermis. Für alle Messungen wurde der Median von 30 Auswertungen (n = 3, je Maus 10 nicht-überlappende Bereiche in aufeinanderfolgenden Schnitten) dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney *U*-Tests (2.2.10.) berechnet. Alle Zählungen wurden von zwei unabhängigen Beobachtern durchgeführt.

2.2.4. *In vivo* Depletion von T-Zellen

Um die Bedeutung von T-Lymphozyten für die Ausbildung des psoriasiformen Phänotyps bei PL/J-Mäusen festzustellen, wurden Subpopulationen der T-Zellen *in vivo* depletiert. Zur Depletion von T-Zellen wurden 100 bis 150 µg der mCD4 (GK1.5) beziehungsweise mCD8 (53-6.7) mAk an drei aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal (*i.p.*) injiziert. Im folgenden wurden die Injektionen jeden dritten Tag über einen Zeitraum von 45 beziehungsweise 33 Tagen verabreicht. Zur Kontrolle wurden Mäuse, die eine vergleichbar schwere psoriasiforme Dermatitis aufwiesen, auf gleiche Weise mit Isotyp-IgG mAk behandelt. Die Effizienz der Depletion wurde zum einen mittels einer FACS-Analyse der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Behandlung und zum anderen mittels Immunfärbungen von Hautbiopsien, die mit einer sterilen Biopsiestanze (Durchmesser 4 mm) nach Beendigung der Behandlung entnommen wurden, beurteilt. Zu Beginn und am Ende des Behandlungszeitraums wurde die Ohrdicke als grober Hinweis auf Entzündung gemessen und das klinische Bild mittels des adaptierten PASI-Scores (2.1.3.2.) beurteilt. Außerdem wurden mit einer Kamera Aufnahmen von den Tieren gemacht, um Veränderungen im psoriasiformen Phänotyp der CD18 hypomorphen Mäuse dokumentieren

zu können. Hierzu wurden diese mit einem Gemisch aus 100 mg Ketamin und 16 mg Xylazin pro kg Körpergewicht narkotisiert, das der Maus intraperitoneal gespritzt wurde. Während der Narkose wurde Augensalbe auf die Augen der Mäuse aufgetragen.

2.2.5. Magnetisches Zellsortieren (MACS)

Mit dem Prinzip der magnetischen Zellsortierung („Magnetic Activated Cell Sorting“, MACS) konnten Zellpopulationen einer gemischten Population sowohl depletiert als auch angereichert werden (Miltenyi et al. 1990). Hierbei wurden die Zellen mit Antikörpern, an die paramagnetische Partikel gekoppelt waren, markiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine mit Edelstahldrähten gefüllte Säule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befand. Während die markierten Zellen durch die paramagnetischen Partikel in der Säule zurückgehalten wurden (Positivfraktion), passierten die unmarkierten Zellen (Negativfraktion) die Säule.
Zur positiven Selektion von $CD90^+$ T-Zellen wurden Zellen aus dränierenden Lymphknoten gewonnen, in 180 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 20 µl des partikelgekoppelten Antikörpers (mCD90 MACS Beads) 15 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 15 ml MACS-Puffer (10 min, 1100 rpm) wurden die Zellen in einem Volumen von 500 µl Puffer auf eine MiniMACS-Säule, die sich in einem Magnetfeld befand, aufgetragen. Nach dreimaligem Spülen mit 500 µl MACS-Puffer wurde die MACS-Säule aus dem Magnetfeld genommen und die Positivfraktion mit 1 ml MACS-Puffer unter Verwendung eines Spritzenstempels aus der Säule gedrückt.

2.2.6. Durchflusszytometrie (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting”, FACS) wurden Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und bestimmter Strukturen, die durch Immunfluoreszenz detektiert wurden, charakterisiert. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit fluorochrommarkierten Antikörpern (direkte Immunfluoreszenz) durchgeführt. Die Fluorochrome, mit denen die Proben markiert waren, wurden durch Laser zur Fluoreszenz angeregt, woraufhin jeder Farbstoff Licht einer charakteristischen Wellenlänge abstrahlte. Lagen die Emissionswellenlängen weit genug auseinander, konnte man verschiedene Fluorochrome parallel einsetzen und analysieren.

2.2.6.1. Immunfluoreszenzfärbungen zellulärer Oberflächenstrukturen

Um den Prozentsatz im Blutsystem zirkulierender Entzündungszellen und ihren Phänotyp anhand von Zellmembranantigenen zu analysieren, wurde den Mäusen peripheres Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte durch Anritzen der lateralen Schwanzvene mit einer Rasierklinge. Hierbei wurden den Tieren pro Sitzung und Woche maximal 0,3 ml Blut entnommen. Um ein Verklumpen zu verhindern, wurde das Blut mit Heparin (Liquemin® N 25000) gemischt. Alternativ wurden Zellen aus der Milz von Mäusen gewonnen. Rote Blutzellen wurden mittels eines ACK-Lysepuffers entfernt und die verbleibende PBMC Zellfraktion auf 1 x 10^6 Zellen/50 µl eingestellt. Anschließend wurden 50 µl dieser Zellsuspension mit ≤ 1 µl der Fluorochrom-konjugierten mAk für 30 min bei 4°C gefärbt. Nach Waschen in Cell Wash und Fixierung der Zellen in 2 % Formaldehyd wurden die gefärbten PBMC an einem Durchflusszytometers (FACSCalibur®) gemessen. Zur Analyse der Fluoreszenzdaten wurde das Programm CellQuest (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet.
Zur Feststellung des Aktivierungszustands von T-Zellen wurde deren Zelloberflächenexpression von IL-2Rα bestimmt. Hierzu wurden $CD90^+$ Zellen wie unter 2.2.5. beschrieben isoliert und über Nacht kultiviert. Insgesamt 1 x 10^6 T-Zellen je Maus wurden mittels FACS unter Verwendung einer Dreifach-Fluoreszenz-Färbung (mCD25 FITC/mCD4 PE/mCD3 CyChrome) mit ≤ 1 µl jedes Fluorochrom-konjugierten mAk analysiert.

2.2.6.2. Immunfluoreszenzfärbungen intrazellulärer Zytokine

Zur Bestimmung der Zytokinproduktion von T-Zellen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Grabbe in der Abteilung für Dermatologie der Universität Münster intrazelluläre Zytokinfärbungen durchgeführt. $CD90^+$ T-Zellen wurden, wie unter 2.2.5. beschrieben, aus dränierenden Lymphknoten von $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen isoliert und entweder über Nacht oder für 7 Tage in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FCS und 4 µg/ml Ciprobay® 2000 und in Anwesenheit von 3 ng/ml PMA und 300 ng/ml Ionomycin bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Um die Sekretion von Zytokinen durch die Zellen zu verhindern, wurde 1 µg/ml Brefeldin A zugesetzt und die Zellen für 4 h bei 37°C, 5 % CO_2 inkubiert. Pro Färbung wurden insgesamt 1 x 10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml PBS (1 % FCS) gewaschen. Nach Resuspendieren in 50 µl PBS (1 % FCS) wurde eine Oberflächenfärbung mit den angegebenen Ak für 30 min bei 4°C durchgeführt. Danach

wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS (1 % FCS) gewaschen und daraufhin mit 1 % Paraformaldehyd für 15 min fixiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und in 50 µl 1 % Saponin für 5 min bei RT permeabilisiert, bevor die angegebenen Ak (1:10) zu den Proben hinzugegeben wurden (30 min, 4°C). Nach zwei weiteren Waschschritten mit 1 ml PBS (1 % FCS) wurden die Zellen in 500 µl PBS/1 % Paraformaldehyd resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen durchflusszytometrisch mittels eines FACSCalibur analysiert.

2.2.7. Zytokinfreisetzung

2.2.7.1. Zytokinbestimmung mittels ELISA

Um die Zytokinfreisetzung von T-Zellen zu bestimmen, wurden $CD90^+$ Zellen wie unter 2.2.5. beschrieben isoliert. Die Zellen (2×10^5 je Vertiefung) wurden durch Inkubation mit immobilisiertem anti-CD3 mAk und anti-CD28 mAk in den angegebenen Konzentrationen in 96-Loch-Platten aktiviert. Nach Inkubation für 24 h bei 37°C wurden die Überstände gesammelt und bei –20°C eingefroren. Die Zytokinkonzentrationen von IFN-γ und IL-4 wurden mittels Quantikine® M ELISA (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) entsprechend den mitgelieferten Protokollen gemessen.
Generell wurden bei diesen "Sandwich"-ELISA die Zellkulturüberstände in Vertiefungen einer 96-Loch-Platte gegeben, die mit für das zu testende Zytokin spezifischen Fangantikörpern beschichtet waren. Die Detektion erfolgte über zytokinspezifische enzymkonjugierte Antikörper ("Detection Antibody"). Die Menge des gebundenen Detektionsantikörpers wurde nach Zugabe des entsprechenden Enzymsubstrates bestimmt. Die Berechnung der Zytokinkonzentrationen erfolgte anhand einer Standardkurve, die durch Kontrollmessungen von Proben definierter Zytokinkonzentrationen berechnet wurde.

2.2.7.2. Zytokinbestimmung mittels der „Cytometric Bead Array“ Technik (CBA)

Alternativ wurden die angegebenen Zytokine in den Überständen von $CD90^+$ T-Zellen gemessen, die über Nacht in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FCS und 4 µg/ml Ciprobay® 2000 und in Anwesenheit von 3 ng/ml PMA und 300 ng/ml Ionomycin bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert wurden. Dies geschah in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Grabbe in der Abteilung für Dermatologie der Universität Münster. Um die

verschiedenen Zytokine gleichzeitig in einer Probe zu bestimmen, wurde die „Cytometric Bead Array“ Technik (BD Mouse Inflammation CBA, BD Mouse Th1/Th2 CBA; BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Alle Färbungen und Analysen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.
Generell wurden beim CBA Kügelchen (Beads) mit abgestuften Mengen eines fluoreszierenden Farbstoffs markiert. Die verschiedenen Intensitäten des Fluorochroms konnten später bei der Analyse klar unterschieden werden, wenn die Emissionswellenlänge des Farbstoffs am Durchflusszytometer gemessen wurde. Jede Gruppe dieser unterschiedlich markierten Kügelchen wurde mit Antikörpern gekoppelt, die für ein bestimmtes Zytokin spezifisch waren. Bei Inkubation einer Probe mit diesen Kügelchen ließen sich somit verschiedene Zytokine gleichzeitig detektieren und unterscheiden. Die Menge der jeweiligen Zytokine ließ sich durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern ermitteln, die mit einem weiteren Fluorochrom (PE) gekoppelt waren.

2.2.8. Allergische Kontaktdermatitis (ACD)

Die Messung der allergischen Kontakt-Dermatitis (ACD) ist ein *in vivo* Assay zur Bestimmung der zellulären Immunantwort durch T-Zellen. Zum Sensibilisieren wurden die Mäuse am Bauch rasiert und mit einer Pipette 100 µl 2 % Oxazolon (4-Ethoxymethylen-2-Phenyl-2-Oxazolin-5-On) gelöst in Aceton/Olivenöl (4:1) aufgetragen. Nach 5 Tagen wurden zum Auslösen der ACD je 10 µl 0,5 % Oxazolon auf beide Seiten eines Ohres aufpipettiert. Die Mäuse wurden anschließend einzeln gehalten, um ein gegenseitiges Ablecken der Ohren zu verhindern. Die Ohrdicke wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (vor beziehungsweise 3, 6, 30 und 42 Stunden nach Auslösen der ACD) mittels einer kalibrierten Mikrometerschraube gemessen. Um die Ohrschwellung zu berechnen, mittels derer auf das sich ausbildende Ödem geschlossen werden kann, wurde die Ohrdicke vor Auslösen der ACD (t = 0) von der Ohrdicke nach Auslösen (t = 3, 6, 30, 42 h) subtrahiert.

2.2.9. Kopplungsanalyse

Die Kopplungsanalyse wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Rikard Holmdahl (Abteilung Medical Inflammation Research, Institut für Zell- und Molekularbiologie, Universität Lund) durchgeführt.

2.2.9.1. Vorbereiten der Genotypisierung mittels Mikrosatellitenanalyse

2.2.9.1.1. Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien (Denaturierung mittels Natriumhydroxid)

Nach Ende des Beobachtungszeitraums wurde aus dem Schwanz der Tiere DNA isoliert. Hierzu wurden 0,5 - 2,0 cm des Schwanzes für 2 h unter Schütteln bei 95°C in 400 µl 50 mM Natriumhydroxid inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 1M Tris-HCl (pH8, kurzes Vortexen) wurden die unlöslichen Reste für 12 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und die DNA im Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese einfache und schnelle Art der DNA-Gewinnung konnte verwendet werden, da der Reinheitsgrad der DNA nicht hoch sein musste. Anschließend wurde die Konzentration der DNA mit einem UV-Spektrometer gemessen.

2.2.9.1.2. Datenbanksuche nach polymorphen Mikrosatellitenmarkern

Die Suche nach Mikrosatellitenmarkern, die polymorph bezüglich der beiden Mausstämme PL/J und C57BL/6J sind, erfolgte über Datenbanken, die im Internet zur Verfügung standen. Vorrangige Quelle waren die Internetseiten des „Center for Inherited Disease Research“ (CIDR, http://www.cidr.jhmi.edu/index.html). Zusätzliche polymorphe Marker ließen sich über die „Mouse Genome Informatics“ (MGI) Internetseiten des Jackson Laboratory (http://www.informatics.jax.org/) ermitteln. In den Fällen, in denen noch Abstände von 30 cM oder mehr zwischen den ermittelten Markern lagen, wurden weitere Marker getestet, die in diesem Bereich verfügbar waren.

2.2.9.2. Genotypisierung mittels Mikrosatellitenanalyse

2.2.9.2.1. Verwendete Mikrosatellitenmarker

In Anhang 2 findet sich eine Liste mit den verwendeten Mikrosatellitenmarkern, wobei nur diejenigen angegeben sind, die letztendlich auch in der Kopplungsanalyse eingesetzt wurden. Die Forward-Primer waren jeweils mit einem der folgenden Fluorochrome gekoppelt: TET, FAM, HEX oder NED. Die Sequenzen der Forward- und Reverse-Primer findet man im Internet unter http://www.informatics.jax.org/. Mit Ausnahme der mit NED gekoppelten Primer (Applied Biosystems) stammten alle Primer von MWG-Biotech AG.

2.2.9.2.2. Standardisierte PCR

Alle PCR-Untersuchungen wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Um die optimale DNA-Menge für die PCR zu ermitteln, wurden zunächst verschiedene Mengen DNA (10, 50 oder 100 ng/µl) als Template eingesetzt. Später wurde eine Konzentration von 10 ng/µl verwendet. Das folgende Reaktionsgemisch wurde angesetzt:

1	µl	DNA
0,3	µl	Primer F (10 µM)
0,3	µl	Primer R (10 µM)
1	µl	10 x Puffer
0,1	µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
7,25	µl	H_2O
0,05	µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
10	µl	

Für alle Primerpaare wurde standardmäßig das folgende Programm verwendet:

94°C	2,5 min	
94°C	30 sek	
56°C	45 sek	30x
72°C	1 min	
72°C	6 min	
4°C	∞	

2.2.9.2.3. Entsalzen der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden entsalzt und für eine Zeit- und Kosten-effizientere Analyse auf der Basis des Fluorochroms und der Fragmentlänge vereinigt. Dabei war für Marker, die mit dem gleichen Farbstoff gekoppelt waren, darauf zu achten, dass sich die Fragmentlängen der einzelnen Marker um mindestens 20 bp unterschieden, um bei der Analyse eindeutige Resultate zu erhalten.

Das Entsalzen wurde entweder direkt in MegaBACE-Platten oder in PCR-Platten durchgeführt. In beiden Fällen wurden 3 µl jedes PCR-Produktes in die jeweiligen Vertiefungen gegeben und jede Vertiefung mit H_2O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl tRNA, 2 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 60 µl 95 % Ethanol in jede Vertiefung wurde die DNA auf Eis gefällt und 15 min bei 4°C und 5600 rpm abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in 100 µl 70 % EtOH wurde die DNA über Nacht bei RT oder 1,5 h bei 55°C getrocknet. Wurde das Entsalzen in MegaBACE-Platten durchgeführt, wurde die DNA in 8 µl Standardmix (Standard, 1:46 verdünnt in H_2O) aufgenommen. Wurde das Entsalzen dagegen in PCR-Platten durchgeführt, wurde die DNA zunächst in 5 µl H_2O gelöst und davon 2 µl zur Analyse in MegaBACE-Platten mit 5 µl Standardmix (Standard, 1:29 verdünnt in H_2O) vermischt.

2.2.9.2.4. Auftrennung und Längenbestimmung der PCR-Produkte

Nach dem Entsalzen wurden die Proben mit dem MegaBACE^{1000} analysiert. Hierbei wurden die PCR-Produkte mittels Kapillar-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Fluorochrome, mit denen die Proben markiert waren, wurden durch Laser zur Fluoreszenz angeregt, wobei jeder Farbstoff Licht einer charakteristischen Wellenlänge abstrahlte. Mit Hilfe verschiedener Filter konnten parallel vier verschiedene Farbstoffe detektiert und unterschieden werden. Für den mit einem roten Farbstoff (ROX, 607 nm) markierten Standard war ein Kanal reserviert, während sich die Fluorochrome, mit denen die PCR-Produkte markiert waren, folgendermaßen kombinieren ließen: FAM (522 nm) = blau, TET (538 nm) = grün, HEX (553 nm) = gelb oder FAM = blau, HEX = grün, NED (582 nm) = gelb.
Aus der Position der PCR-Produkte in den Kapillaren konnte ihre jeweilige Größe berechnet werden, wobei der zu jeder Probe hinzugegebene Größenstandard als Referenz diente. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Genetic Profiler“ durchgeführt.

2.2.9.3. Berechnung der Kopplung

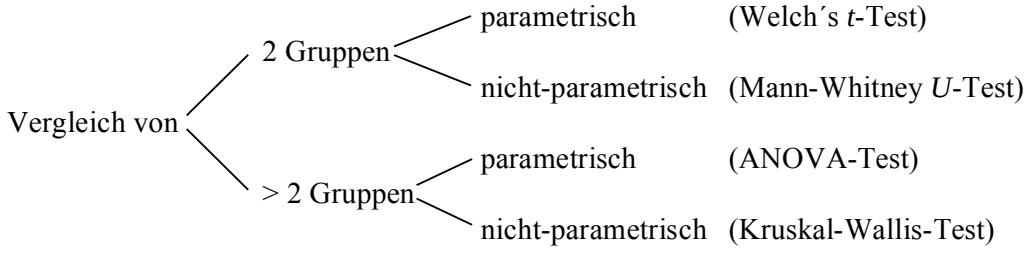
Die Kopplungsanalyse erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Map Manager QTX (Manly et al. 2001; verfügbar unter http://mapmgr.roswellpark.org/mmQTX.html) und R/qtl (Broman et al. 2003; verfügbar unter http://www.biostat.jhsph.edu/~kbroman/qtl/). Die angegebenen Ergebnisse wurden mit der Imputationsmethode (Schafer 1999) ermittelt. Da man bei

einer Rückkreuzung lediglich Heterozygotie (H) oder Homozygotie für den Stamm, auf den rückgekreuzt wurde (B), eingeben konnte, musste das Chromosom X für die Analyse weggelassen werden, da hier zusätzlich Hemizygotie für das Allel des C57BL/6J-Stammes (A) auftrat.

Das Programm R/qtl bestimmte nicht nur die LOD-Scores für die Marker selbst, sondern auch für Positionen zwischen den Markern, wobei ausgehend vom ersten Marker auf dem jeweiligen Chromosom in Schritten von 2 cM vorgegangen wurde. Es wurden die LOD-Scores für die unter 2.2.1.3.1. angegebenen Phänotypen ermittelt, wobei die Berechnungen unter drei verschiedenen Annahmen durchgeführt wurden. Zum einen wurde angenommen, dass das Geschlecht keinen Einfluss ausübte und zum anderen, dass es eine Rolle spielte, wobei wiederum unterschieden wurde, ob es als additive Covariante wirkte oder als interaktive. Durch Permutationstests wurden die Signifikanzschwellen (90 %; 95 %; 99 %) für die einzelnen Phänotypen berechnet. Hierbei wurden die Genotypen der Mäuse der N2-Generation konstant gehalten, aber ihre Phänotypen zufällig vermischt. Dies wurde 1000 mal wiederholt und jedes Mal der höchste LOD-Score in einer Kopplungsanalyse bestimmt.

2.2.10. Statistische Auswertungen

Zur Entscheidung, ob ein Unterschied bezüglich einer Messgröße zwischen Gruppen besteht, wurden statistische Tests verwendet. Der *p*-Wert entspricht der Wahrscheinlichkeit des Auftretens der beobachteten Werte unter der Annahme, dass kein Unterschied zwischen den Gruppen besteht (Nullhypothese). Ist diese Wahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ($p < 0{,}05$), wird die Nullhypothese abgelehnt und der Unterschied zwischen den Gruppen als signifikant bezeichnet. Je nachdem, ob zwei oder mehr Gruppen miteinander verglichen wurden, beziehungsweise ob eine beliebige (nicht-parametrische) oder Normal- (parametrische) Verteilung vorlag, wurden folgende statistische Tests angewandt.



3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der psoriasiformen Dermatitis im CD18^{hypo} PL/J-Mausmodell

Die Psoriasis vulgaris ist eine Hauterkrankung, die durch Hyperproliferation in der Epidermis und ein ausgeprägtes entzündliches Infiltrat gekennzeichnet ist. Nach dem Stand der Forschung spielen T-Zell-vermittelte immunologische Prozesse bei der Entstehung der Psoriasis eine entscheidende Rolle. T-Zellen werden als Hauptakteure in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris angesehen, wobei nach bisherigen Erkenntnissen der Th1-Typ in Psoriasispatienten überwiegt.
PL/J-Mäuse mit einer hypomorphen Mutation im CD18-Gen (CD18^{hypo}) entwickeln eine psoriasiforme Dermatitis, die der Psoriasis des Menschen sowohl aufgrund der klinischen und histologischen Merkmale als auch im Ansprechen auf Therapien stark ähnelt. Im Gegensatz dazu entwickeln CD18^{hypo} C57BL/6J-Mäuse keine Anzeichen dieses Phänotyps. CD18^{hypo} PL/J-Mäuse könnten somit ein geeignetes Modell darstellen, um die Pathogenese und den polygenen Charakter der Psoriasis zu untersuchen. Um Aufschlüsse über die Ähnlichkeit des CD18^{hypo} psoriasiformen PL/J-Mausmodells zu der Psoriasis des Menschen zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die an der Erkrankung beteiligten Zellen des Immunsystems und hierbei insbesondere die T-Zellen näher charakterisiert und verglichen (Abschnitt 3.3.). Im Anschluss wurde die Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis untersucht (Abschnitt 3.4. bis 3.6.). Im letzten Teil wurden eine Rückkreuzung zwischen CD18^{hypo} PL/J- und C57BL/6J-Mäusen und Kopplungsanalysen durchgeführt, um Chromosomenabschnitte zu identifizieren, auf denen sich Gene befinden, die an der Entstehung der psoriasiformen Hauterkrankung beteiligt sind (Abschnitt 3.7.).

3.2. Schnellere Genotypisierung von CD18^{hypo} und CD18^{null} Mäusen durch eine PCR-gestützte Genotypisierungsmethode im Vergleich zur RFLP-Analyse

Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurden Mäuse des PL/J-Stammes verwendet, die homozygot entweder eine Null- (CD18^{null}) oder eine hypomorphe Mutation (CD18^{hypo}) im CD18-Gen trugen (siehe 2.2.1.1.). Die Nachkommen wurden durch RFLP-Analyse auf die Mutation des CD18-Gens untersucht (siehe 2.2.2.2. und Abb. 6). Um eine schnellere Genotypisierung zu ermöglichen, wurde eine PCR-gestützte Genotypisierungsme-

thode erarbeitet (siehe 2.2.2.3.). Dadurch ließ sich der Genotyp der $CD18^{null}$ Mäuse eindeutig bestimmen (Abb. 7). $CD18^{hypo/wt}$ und $CD18^{hypo}$ konnten von $CD18^{wt}$ Tieren unterschieden werden. In Kombination mit einer FACS-Analyse, in der sich $CD18^{hypo}$ von $CD18^{hypo/wt}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen unterscheiden ließen (siehe 2.2.2.4. und Abb. 8), konnte der Genotyp der Mäuse bezüglich der CD18 hypomorphen Mutation eindeutig bestimmt werden.

3.3. Charakterisierung des $CD18^{hypo}$ psoriasiformen Mausmodells

β_2-Integrine sind Heterodimere, die sich aus einer α- (CD11) und einer β-Kette (CD18) zusammensetzen. Eine Mutation im CD18-Gen könnte sich auf die Assoziationsfähigkeit von CD18 mit seinen Bindungspartnern auswirken. Daher wurde die Expression von CD11 auf Zellen aus $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen verglichen.
Weiterhin wurde die Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis des $CD18^{hypo}$ Mausmodells untersucht. Die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates bei der psoriasiformen Dermatitis wurde ermittelt. Zelltypen, von denen angenommen wird, dass sie an der Entstehung der humanen Psoriasis eine Rolle spielen, wurden analysiert. Das Vorhandensein von Zellen des Immunsystems in der Haut von $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen wurde mittels immunhistologischer Färbung quantitativ bestimmt. Im Anschluss wurden T-Zellen, die als Hauptakteure in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris angesehen werden und von denen bekannt ist, dass der Th1-Typ in Psoriasispatienten überwiegt, hinsichtlich ihres Aktivierungszustands und ihrer Zytokinproduktion in $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen analysiert.

3.3.1. Quantitative Unterschiede in den α-Untereinheiten von β_2-Integrinen zwischen $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Leukozyten

Die verminderte Expression des $CD18^{hypo}$ Proteins auf der Zelloberfläche von Leukozyten im $CD18^{hypo}$ psoriasiformen Mausmodell könnte die Fähigkeit von CD18 zur Dimerisierung mit den β_2-assoziierten α-Untereinheiten beeinflussen. Daher wurde die Expression der drei am häufigsten vorkommenden α-Untereinheiten CD11a, CD11b und CD11c auf der Zelloberfläche von $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Leukozyten, auch in Bezug auf die CD18-Expression, miteinander verglichen. Die Expression wurde nach Färbung mit entsprechenden mAk, die spezifisch für das jeweilige CD11-Protein beziehungsweise CD18 waren, mittels FACS (siehe 2.2.6.1.) analysiert. Auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC; Abb. 9*A*) war

die Expression aller drei α-Untereinheiten für CD18^{hypo} (dunkelgraue Flächen) im Vergleich zu CD18^{wt} Mäusen (weiße Flächen) vermindert. Am stärksten war die Abnahme an CD11a auf etwa 1/10, während CD11b und CD11c etwa um die Hälfte reduziert waren. Für alle drei α-Ketten war die mittlere Fluoreszenzintensität der CD18^{hypo} Tiere doppelt so hoch wie bei Färbung mit den jeweiligen Isotyp-Kontroll-mAk (hellgraue Flächen). Die CD18-Bindungspartner waren also noch auf PBMC dieser Mäuse vorhanden. Die CD18-Expression war bei

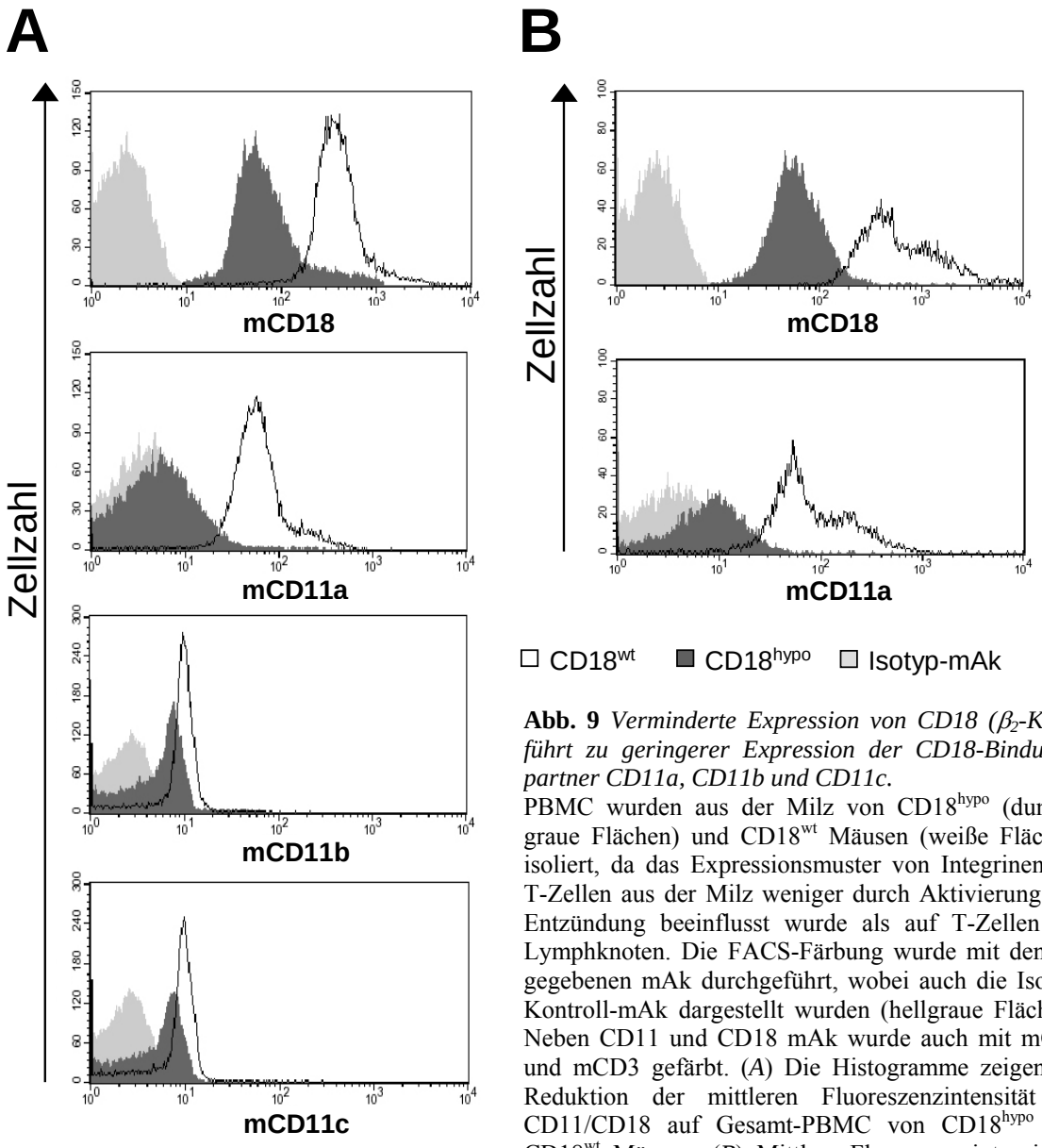


Abb. 9 *Verminderte Expression von CD18 (β_2-Kette) führt zu geringerer Expression der CD18-Bindungspartner CD11a, CD11b und CD11c.*
PBMC wurden aus der Milz von CD18^{hypo} (dunkelgraue Flächen) und CD18^{wt} Mäusen (weiße Flächen) isoliert, da das Expressionsmuster von Integrinen auf T-Zellen aus der Milz weniger durch Aktivierung und Entzündung beeinflusst wurde als auf T-Zellen aus Lymphknoten. Die FACS-Färbung wurde mit den angegebenen mAk durchgeführt, wobei auch die Isotyp-Kontroll-mAk dargestellt wurden (hellgraue Flächen). Neben CD11 und CD18 mAk wurde auch mit mCD4 und mCD3 gefärbt. (*A*) Die Histogramme zeigen die Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität für CD11/CD18 auf Gesamt-PBMC von CD18^{hypo} und CD18^{wt} Mäusen. (*B*) Mittlere Fluoreszenzintensitäten von CD18 und CD11a, die zusammen LFA-1 als bisher einziges bekanntes auf CD4$^+$ T-Zellen exprimiertes β_2-Integrin formen. Sie waren auch auf den hier ausschließlich analysierten CD4$^+$CD3$^+$ Zellen signifikant reduziert.

$CD18^{hypo}$ (dunkelgraue Flächen) im Vergleich zu $CD18^{wt}$ Mäusen (weiße Flächen) auf 20 % verringert. Eine auf 10 % verminderte Menge an CD11a und CD18 wurde für $CD4^+$ T-Zellen festgestellt, die aufgrund der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD3 identifiziert und gesondert betrachtet wurden (Abb. 9*B*). Für diese Zellpopulation wurde lediglich CD11a als α-Kette analysiert, da LFA-1, das CD11a zusammen mit CD18 formt, das bisher einzige bekannte auf $CD4^+$ T-Zellen exprimierte β_2-Integrin ist. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die β_2-Integrin-Defizienz, die primär von der β_2-Untereinheit (CD18) ausgeht, sekundär zu einer Reduktion der α-Ketten führt.

3.3.2. Starke Vermehrung von T-Zellen und Makrophagen in psoriatischen Läsionen von $CD18^{hypo}$ Mäusen

Für die Pathogenese der Psoriasis vulgaris wird eine Beteiligung immunologischer Prozesse angenommen. T-Zellen werden nach dem Stand der Forschung als Hauptakteure angesehen. Sie sind in betroffener Haut von Psoriasispatienten stark vermehrt. Zur Bestimmung der Rolle von T-Zellen in der psoriasiformen Dermatitis wurden 30 Hautschnitte von $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen (n = 3) mit anti-CD4 und anti-CD8 mAk immunhistologisch gefärbt (siehe 2.2.3.1.). Im Vergleich zu $CD18^{wt}$ Haut mit nur wenigen $CD4^+$ T-Zellen in der Dermis (Abb. 10*A*) war die Anzahl von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis von $CD18^{hypo}$ Mäusen stark erhöht (Abb. 10*B*). Die Quantifizierung ergab für $CD4^+$ T-Zellen einen 20-fachen Anstieg in der Dermis und einen mehr als 500-fachen Anstieg in der Epidermis (Abb. 10*C*). $CD8^+$ T-Zellen zeigten eine Erhöhung auf das 8-fache in der Dermis und auf das 140-fache in der Epidermis. Die statistische Auswertung (siehe 2.2.10.) ergab, dass dieser Anstieg für beide Zelltypen sowohl in Dermis als auch in Epidermis signifikant war (Mann-Whitney *U*-Test, $p < 0{,}0001$). Der extrem hohe Anstieg der T-Zellen in der Epidermis beruhte auch darauf, dass $CD18^{hypo}$ (Abb. 10*B*) im Vergleich zu $CD18^{wt}$ Mäusen (Abb. 10*A*) eine stark verdickte Epidermis aufwiesen. Dies ist eines der Hauptcharakteristika psoriatischer Erkrankungen.

Immunhistologische Färbungen wurden auch mit mAk durchgeführt, die Makrophagen und Blutgefäße detektierten. Während in der Haut von $CD18^{wt}$ Mäusen nur wenige Makrophagen vorhanden waren (Abb. 11*A*), war ihre Anzahl in der Dermis von $CD18^{hypo}$ Tieren um das siebenfache erhöht (Abb. 11*B*). Wie für die T-Zellen war auch hier der Anstieg signifikant (Mann-Whitney *U*-Test, $p < 0{,}0001$, Abb. 11*C*). Dagegen zeigte sich bei den Blutgefäßen, die

mit einem gegen PECAM-1 (CD31) gerichteten mAk gefärbt wurden, kein Unterschied zwischen $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen (Abb. 12).

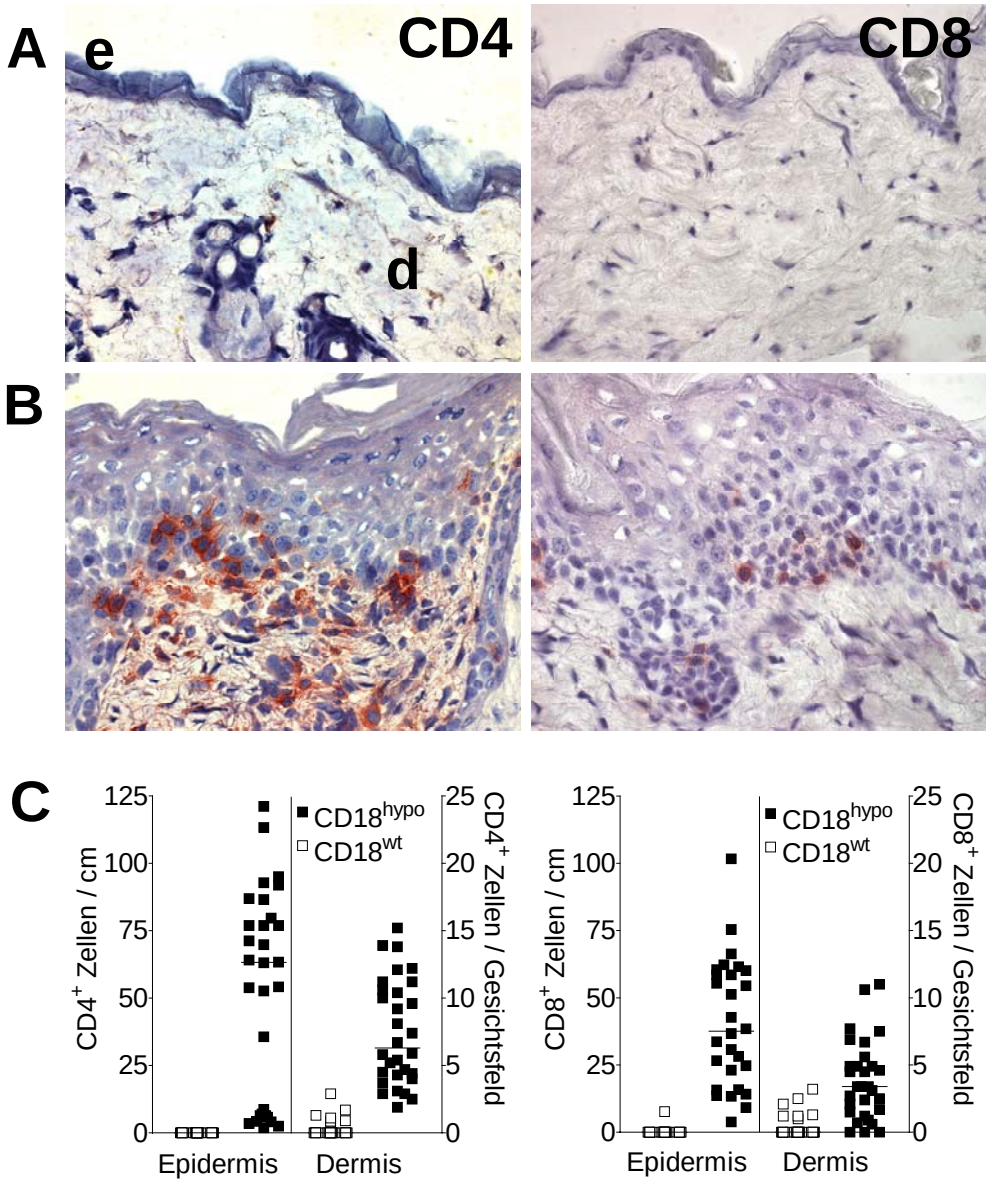


Abb. 10 *Die Anzahl von T-Zellen ist in der Haut von $CD18^{hypo}$ im Vergleich zu $CD18^{wt}$ Mäusen stark vermehrt.* Immunhistologische Färbungen mit gegen CD4 oder CD8 gerichteten mAk wurden auf Gefrierschnitten der Haut von $CD18^{wt}$ (*A*) und $CD18^{hypo}$ Mäusen (*B*) durchgeführt. Ein Peroxidase-Detektionssystem mit AEC als Chromogen wurde verwendet. $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen sind anhand der roten Färbung zu erkennen. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (blaue Färbung) gegengefärbt (ursprüngliche Vergrößerung, x400). (*C*) Quantitative Analyse von T-Zellen in der Haut von $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen. Um Zellen in der Dermis zu quantifizieren, wurde der Prozentsatz von positiv gefärbten Zellen in Bezug zur Gesamtzellzahl gesetzt. Um Zellen in der Epidermis zu quantifizieren, wurde die Anzahl positiv gefärbter Zellen pro cm Epidermis bestimmt. Für alle Messungen wurde der Median aus 30 Zählungen (n = 3) dargestellt. Weiße Quadrate repräsentieren $CD18^{wt}$, schwarze Quadrate $CD18^{hypo}$ Mäuse. Die Unterschiede waren statistisch signifikant ($p < 0{,}0001$). e, Epidermis; d, Dermis.

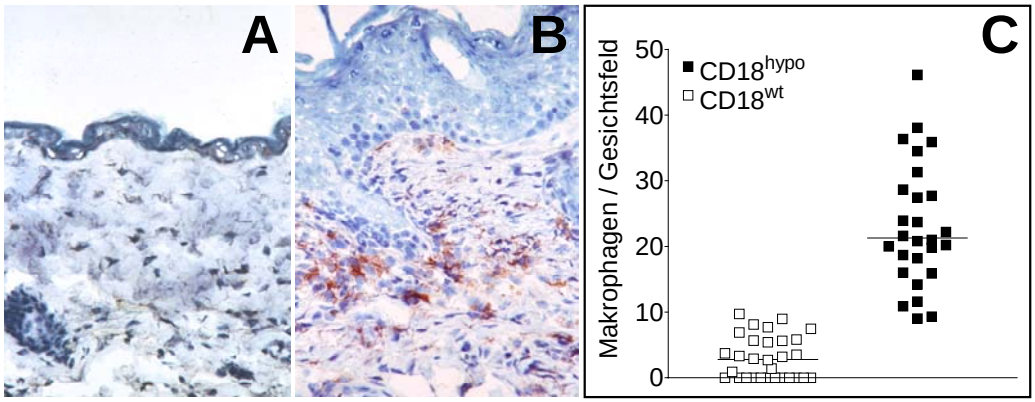


Abb. 11 *Makrophagen sind in der Haut von CD18^{hypo} im Vergleich zu CD18^{wt} Mäusen stark vermehrt.*
Gefrierschnitte der Haut von CD18^{wt} (*A*) und CD18^{hypo} Mäusen (*B*) wurden mit einem gegen Maus-Makrophagen gerichteten mAk immunhistologisch gefärbt. Ein Peroxidase-Detektionssystem mit AEC als Chromogen wurde verwendet. Makrophagen sind anhand der roten Färbung zu erkennen. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (blaue Färbung) gegengefärbt (ursprüngliche Vergrößerung, x400). (*C*) Quantitative Analyse von Makrophagen in der Dermis von CD18^{hypo} und CD18^{wt} Mäusen. Färbung und Quantifizierung wurden wie unter Abb. 10 beschrieben durchgeführt. Weiße Quadrate repräsentieren CD18^{wt}, schwarze Quadrate CD18^{hypo} Mäuse. Die Unterschiede waren statistisch signifikant ($p < 0{,}0001$).

3.3.3. T-Zellen mit vorwiegender Th1-Zytokin-Freisetzung in CD18^{hypo} Mäusen

Nach dem Stand der Forschung handelt es sich bei der Psoriasis des Menschen um eine Th1-vermittelte Erkrankung. Um herauszufinden, ob auch die psoriasiforme Dermatitis der CD18^{hypo} Mäuse Th1-abhängig reguliert wird, wurde das Zytokinmuster nach Stimulation von T-Zellen bestimmt.

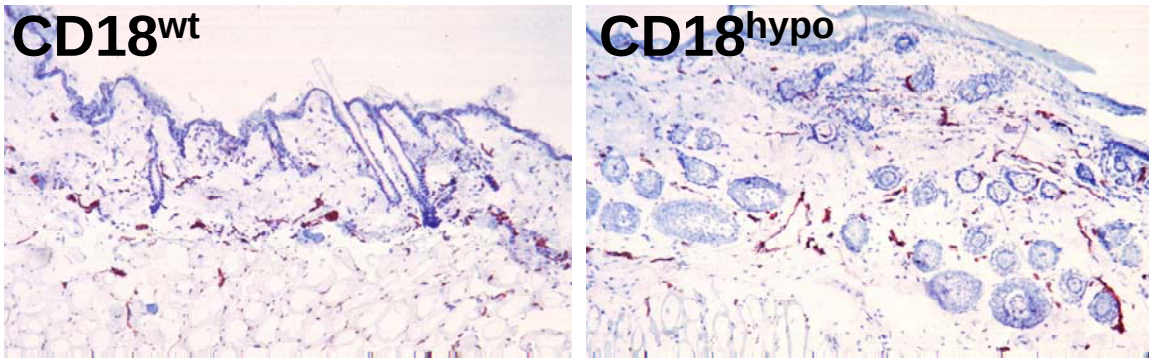


Abb. 12 *Die Anzahl der Blutgefäße in der Haut von CD18^{hypo} Mäusen ist gegenüber CD18^{wt} Mäusen unverändert.*
Gefrierschnitte der Haut von CD18^{wt} und CD18^{hypo} Mäusen wurden mit einem gegen PECAM-1 (CD31) gerichteten mAk immunhistologisch gefärbt. Ein Peroxidase-Detektionssystem mit AEC als Chromogen wurde verwendet. Blutgefäße sind anhand der roten Färbung zu erkennen. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (blaue Färbung) gegengefärbt (ursprüngliche Vergrößerung, x100).

T-Zellen werden aufgrund der von ihnen freigesetzten Zytokine eingeteilt. Produzieren sie vornehmlich IFN-γ, IL-2 und TNF-α ordnet man sie dem Th1-Typ zu, überwiegen dagegen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 spricht man vom Th2-Typ. Der bei $CD18^{hypo}$ Mäusen vorliegende Typ wurde zunächst anhand je eines Schlüsselzytokins aus beiden Gruppen untersucht. $CD90^{+}$ T-Zellen wurden aus dränierenden Lymphknoten isoliert und die Freisetzung von IFN-γ (Th1) und IL-4 (Th2) nach Kultur mit verschiedenen Konzentrationen an immobilisierten anti-CD3 und anti-CD28 mAk mittels ELISA gemessen (siehe 2.2.7.1.). Im Gegensatz zu unbehandelten oder lediglich mit mAk gegen CD28 kultivierten T-Zellen führte bereits eine alleinige Stimulation mit 10 µg/ml anti-CD3 mAk zur Ausschüttung detektierbarer Mengen an IFN-γ (Abb. 13*A*). Die IFN-γ-Freisetzung ließ sich durch zusätzliche Stimulation mit anti-CD28 mAk steigern, wobei bei Konzentrationen von 5 µg/ml anti-CD28 mAk und 10 µg/ml anti-CD3 mAk die größten Mengen gemessen wurden. Unabhängig von der Konzentration der Stimulantien schütteten $CD90^{+}$ T-Zellen von $CD18^{hypo}$ Mäusen im Vergleich zu $CD18^{wt}$ Mäusen signifikant erhöhte IFN-γ-Konzentrationen aus (Welch´s *t*-Test, $p < 0{,}05$). Dieser Unterschied ist bei Stimulation mit 0,5 µg/ml anti-CD28 und 5 µg/ml anti-CD3 mAk mit einer bis zu 30-fach gesteigerten IFN-γ-Konzentration in $CD18^{hypo}$ gegenüber $CD18^{wt}$ Mäusen am höchsten. Dagegen konnte kein IL-4 in den Überständen von aktivierten T-Zellen beider Gruppen detektiert werden.

Da diese Ergebnisse auf ein Vorherrschen von Th1-Zellen in $CD18^{hypo}$ Mäusen hinwiesen, wurde ein Spektrum von Th1-/Th2-Schlüsselzytokinen überprüft, die von aus dränierenden Lymphknoten isolierten T-Zellen freigesetzt wurden. Die Zytokine in den Überständen über Nacht kultivierter T-Zellen wurden mit „Cytometric Bead Arrays“ (CBA) detektiert (siehe 2.2.7.2.). Mit dieser Methode konnten mehrere Zytokine gleichzeitig in einer Probe bestimmt werden. Die Konzentration des Th1-Zytokins IFN-γ war in den Überständen von $CD18^{hypo}$ T-Zellen stark erhöht (Abb. 13*B*). Dagegen lag die Konzentration des Th2-Zytokins IL-4 nur geringfügig über der unteren Detektionsgrenze des Assays, der die ersten ELISA-Ergebnisse betätigte. Neben IFN-γ wurden auch sehr hohe Konzentrationen des Th1-Schlüsselzytokins IL-2 in den Überständen von $CD18^{hypo}$ T-Zellen gefunden. Allerdings war auch das Th2-Zytokin IL-10 leicht erhöht. Dennoch zeigten diese Daten deutlich das Vorherrschen von Th1-Zytokinen in T-Zellen aus den die Hautläsion dränierenden Lymphknoten von $CD18^{hypo}$ Mäusen. Im Vergleich wiesen die Überstände von $CD18^{wt}$ T-Zellen weder erhöhte Mengen der getesteten Zytokine des Th1- noch des Th2-Typs auf.

Noch bevor es bei manchen Zytokinen zur Ausschüttung kommt und sie in den Überständen detektiert werden können, akkumulieren sie in der Zelle. Daher wurden neben den Studien zu den freigesetzten Zytokinen auch die intrazellulär vorhandenen Zytokine in T-Zellen aus dränierenden Lymphknoten gemessen (siehe 2.2.6.2.). Die Membran der $CD90^+$ T-Zellen wurde nach einer Färbung auf Oberflächenmarker mittels Saponin durchlässig gemacht und anschließend mAk gegen die Th1-Zytokine IFN-γ, IL-2 und IL-12 beziehungsweise die Th2-Zytokine IL-4, IL-6 und IL-10 zugegeben. Die Menge der in den Zellen vorhandenen Zytokine wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Für alle drei Th1-Zytokine war der Anteil an Zytokin-produzierenden $CD4^+$ T-Zellen von $CD18^{hypo}$ Mäusen im Vergleich zum Wildtyp

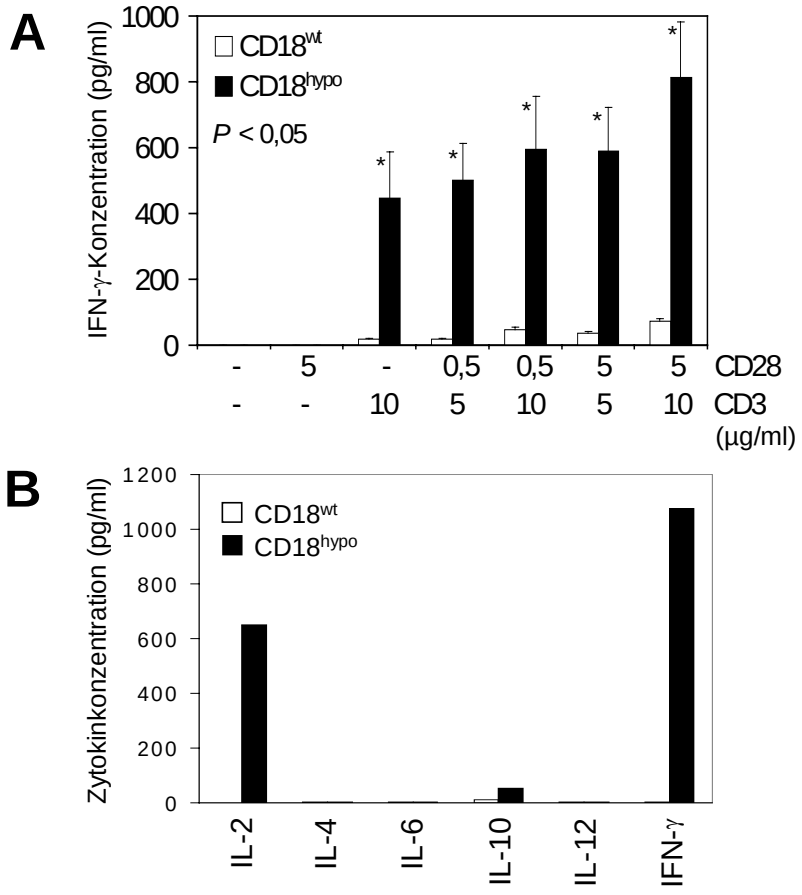


Abb. 13 *T-Zellen von $CD18^{hypo}$ setzen im Vergleich zu $CD18^{wt}$ Mäusen stark erhöhte Mengen an Th1-, nicht aber Th2-Zytokinen frei.*
(*A*) Mittels ELISA gemessene Konzentration an IFN-γ in den Überständen von $CD90^+$ T-Zellen, die 24 h nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an mCD3 und mCD28 mAk aus die Haut dränierenden Lymphknoten von $CD18^{hypo}$ (schwarze Balken) und $CD18^{wt}$ Mäusen (weiße Balken; n = 3) isoliert wurden. (*) $p < 0,05$ für $CD18^{hypo}$ gegenüber $CD18^{wt}$ T-Zellen. (*B*) Simultane Messung der angegebenen Zytokine in Überständen von $CD90^+$ T-Zellen mittels „Cytometric Bead Array" (CBA). T-Zellen wurden in Anwesenheit von 3 ng/ml PMA und 300 ng/ml Ionomycin über Nacht kultiviert, bevor die Überstände für den CBA geerntet wurden. Da jeweils zwei Mäuse untersucht wurden, sind keine Standardabweichungen angegeben.

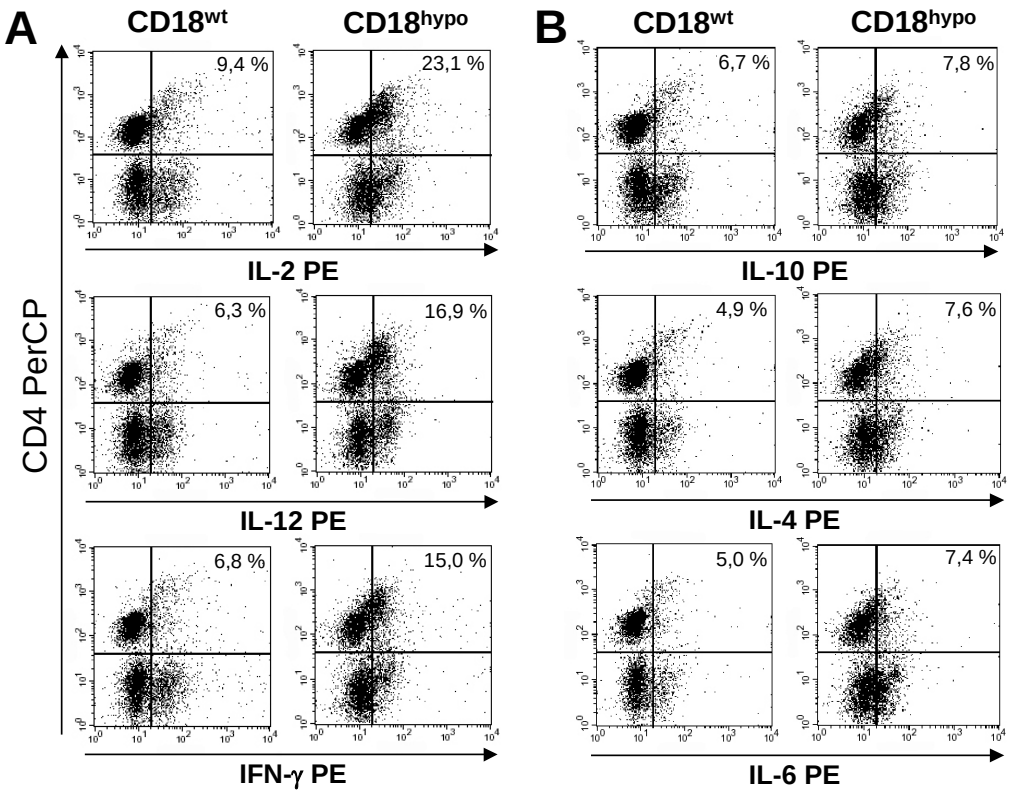


Abb. 14 *Die intrazelluläre Produktion von Th1- und weniger von Th2- Zytokinen nimmt in T-Zellen von CD18^{hypo} gegenüber CD18^{wt} Mäusen zu.*
In diesem Ansatz wurden CD90$^+$ T-Zellen (n = 2) sieben Tage lang in Anwesenheit von 3 ng/ml PMA und 300 ng/ml Ionomycin kultiviert. Nach Entfernen der Überstände von den kultivierten Zellen wurden die T-Zell-Proben einer intrazellulären Fluoreszenzfärbung der angegebenen Zytokine des Th1- (*A*) und Th2-Typs (*B*) unterworfen. Die für die jeweiligen Zytokine spezifischen mAk waren mit dem Fluorochrom PE markiert, der anti-CD4 mAk mit PerCP. Die mittlere Fluoreszenzintensität für die jeweiligen Zytokine ist auf den X-Achsen, die für CD4 auf den Y-Achsen angegeben. Der Anteil an CD4$^+$ T-Zellen, die die jeweiligen Zytokine exprimieren, ist in Prozent angegeben (rechte obere Quadranten). Der Restbestand der CD4$^+$ T-Zellen ist im linken oberen Quadranten zu sehen. Die unteren Quadranten zeigen die CD4$^-$ T-Zellen, die das jeweilige Zytokin entweder produzierten (rechts) oder nicht produzierten (links).

mehr als doppelt so hoch (Abb. 14*A*). Im Gegensatz zu den CBA-Analysen der Überstände wurde eine deutliche Zunahme an intrazellulärem IL-12 gefunden. T-Zellen, die Th2-Zytokine produzierten, waren dagegen nur leicht vermehrt (Abb. 14*B*). Der Anstieg reichte von 1,2-fach für IL-10 bis 1,6-fach für IL-4. Diese Ergebnisse stützten die Erkenntnisse aus der Messung der Zytokinfreisetzung.

3.3.4. Erhöhte Aktivierung von CD4$^+$, nicht aber CD8$^+$ T-Zellen in CD18^{hypo} Mäusen

Eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion in der Haut wird normalerweise dadurch ausgelöst, dass Antigen-präsentierende Zellen (APC) in Lymphknoten wandern und dort den T-Zellen

Antigene präsentieren. Die T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptoren (TCR) spezifisch für diese Antigene sind, werden aktiviert, vermehren sich und gelangen über das Blut in den Bereich der Haut, aus dem die APC stammen. Dort werden Ihnen erneut die Antigene präsentiert und sie initiieren daraufhin eine entzündliche Reaktion. Handelt es sich bei der psoriasiformen Dermatitis der CD18^{hypo} PL/J-Mäuse um eine T-Zell-vermittelte entzündliche Reaktion, müssten in den Haut-dränierenden Lymphknoten betroffener Tiere aktivierte T-Zellen

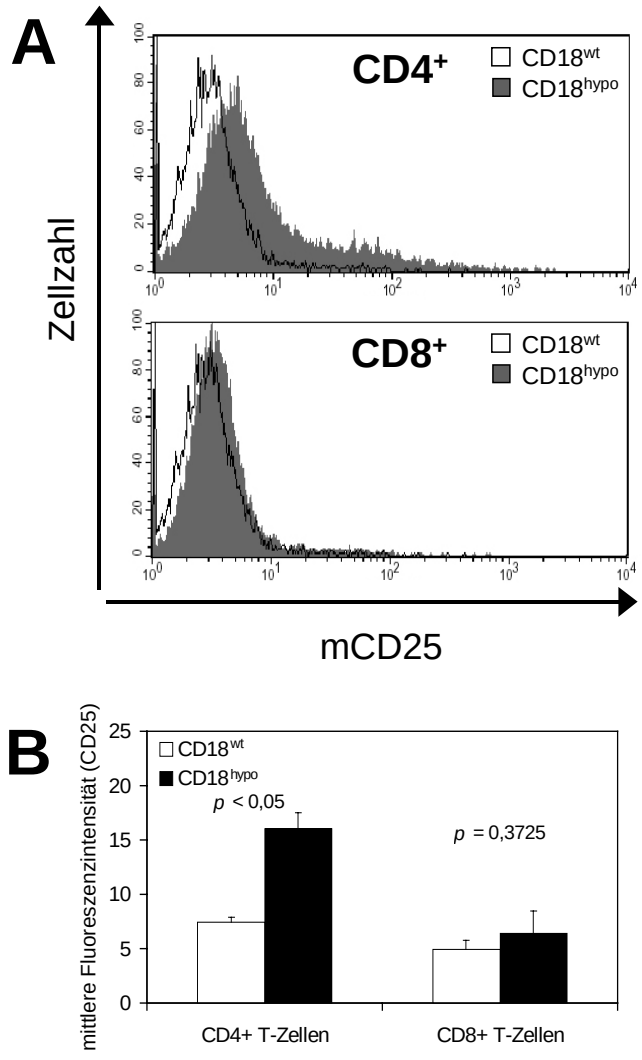


Abb. 15 *CD4$^+$, nicht aber CD8$^+$ T-Zellen sind bei CD18^{hypo} im Gegensatz zu CD18^{wt} Mäusen aktiviert.*
Als Maß für die T-Zell-Aktivierung wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten für CD25 FITC auf T-Zellen, die aus die Haut dränierenden Lymphknoten von CD18^{hypo} und CD18^{wt} Mäusen isoliert wurden, durch FACS-Analyse bestimmt. (*A*) Repräsentative Färbung für CD25, gezeigt für eine von drei CD18^{hypo} (ausgefüllte Fläche) oder CD18^{wt} (weiße Fläche) Mäusen. CD90$^+$ T-Zellen wurden danach getrennt, ob sie positiv für CD4 (oberes Histogramm) oder CD8 (unteres Histogramm) waren. (*B*) Die mittleren Fluoreszenzintensitäten für CD25 FITC auf CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen von CD18^{hypo} (schwarze Balken) und CD18^{wt} Mäusen (weiße Balken) wurden berechnet (n = 3). Für CD4$^+$ T-Zellaktivierung ergaben sich für CD18^{hypo} im Vergleich zu CD18^{wt} Mäusen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), während sie für CD8$^+$ T-Zellaktivierung in Lymphknoten von CD18^{hypo} und CD18^{wt} Mäusen nicht signifikant waren ($p = 0,3725$).

vorliegen. Daher wurden $CD90^+$ T-Zellen aus dränierenden Lymphknoten von $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen isoliert und die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 (IL-2Rα) auf ihrer Oberfläche durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellen wurden in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterteilt und getrennt voneinander betrachtet, um zu sehen, ob ein Unterschied zwischen diesen Subpopulationen besteht. Sowohl im Histogramm (Abb. 15*A*), wie auch im Balkendiagramm (Abb. 15*B*) ließ sich ein signifikanter Anstieg in der Expression von CD25 als Maß für die T-Zellaktivierung auf $CD4^+$ T-Zellen von $CD18^{hypo}$ Mäusen gegenüber $CD18^{wt}$ Mäusen feststellen (Welch´s *t*-Test, $p < 0{,}05$). Dagegen war die CD25-Expression auf $CD8^+$ T-Zellen von $CD18^{hypo}$ Mäusen nur leicht erhöht und unterschied sich nicht signifikant von der Expression auf $CD8^+$ T-Zellen von $CD18^{wt}$ Mäusen ($p = 0{,}3725$). Da die mittlere Expression von CD25 auf $CD4^+$ T-Zellen in $CD18^{hypo}$ doppelt so hoch war wie in $CD18^{wt}$ Mäusen, wies dies auf einen erhöhten Aktivierungszustand der $CD4^+$ T-Zellen von $CD18^{hypo}$ Mäusen hin.

3.4. Entscheidende Rolle von $CD4^+$, nicht aber $CD8^+$ T-Zellen bei der Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis

Nach dem Stand der Forschung handelt es sich bei der Psoriasis um eine Erkrankung, die durch T-Zell-vermittelte immunologische Prozesse initiiert wird. Entsprechend stellen T-Zellen die Hauptakteure dar, die für die Auslösung des Entzündungsprozesses, der letztendlich zur Psoriasiserkrankung führt, verantwortlich sind. Die unter 3.3.2. bis 3.3.4. aufgeführten Ergebnisse weisen darauf hin, dass T-Zellen auch an der Entstehung der psoriasiformen Hauterkrankung der $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäuse beteiligt sind. Um die mögliche Rolle von T-Zellen bei der Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis näher zu analysieren, wurden sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen unter Verwendung depletierender mAk *in vivo* aus $CD18^{hypo}$ Mäusen entfernt.

3.4.1. Abheilung psoriatischer Läsionen nach der Depletion von $CD4^+$ T-Zellen

$CD18^{hypo}$ Mäusen wurden mAk aus der Ratte, die gegen CD4 gerichtet sind (GK1.5), intraperitoneal injiziert (siehe 2.2.4.). Diese mAk binden an Zellen, die CD4 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dies erfolgt über ihre Antigen-bindenden F_{ab}-Teile. Der F_c-Teil der Antikörper wird von der C1-Komponente des Komplementsystems der Maus erkannt und führt zur

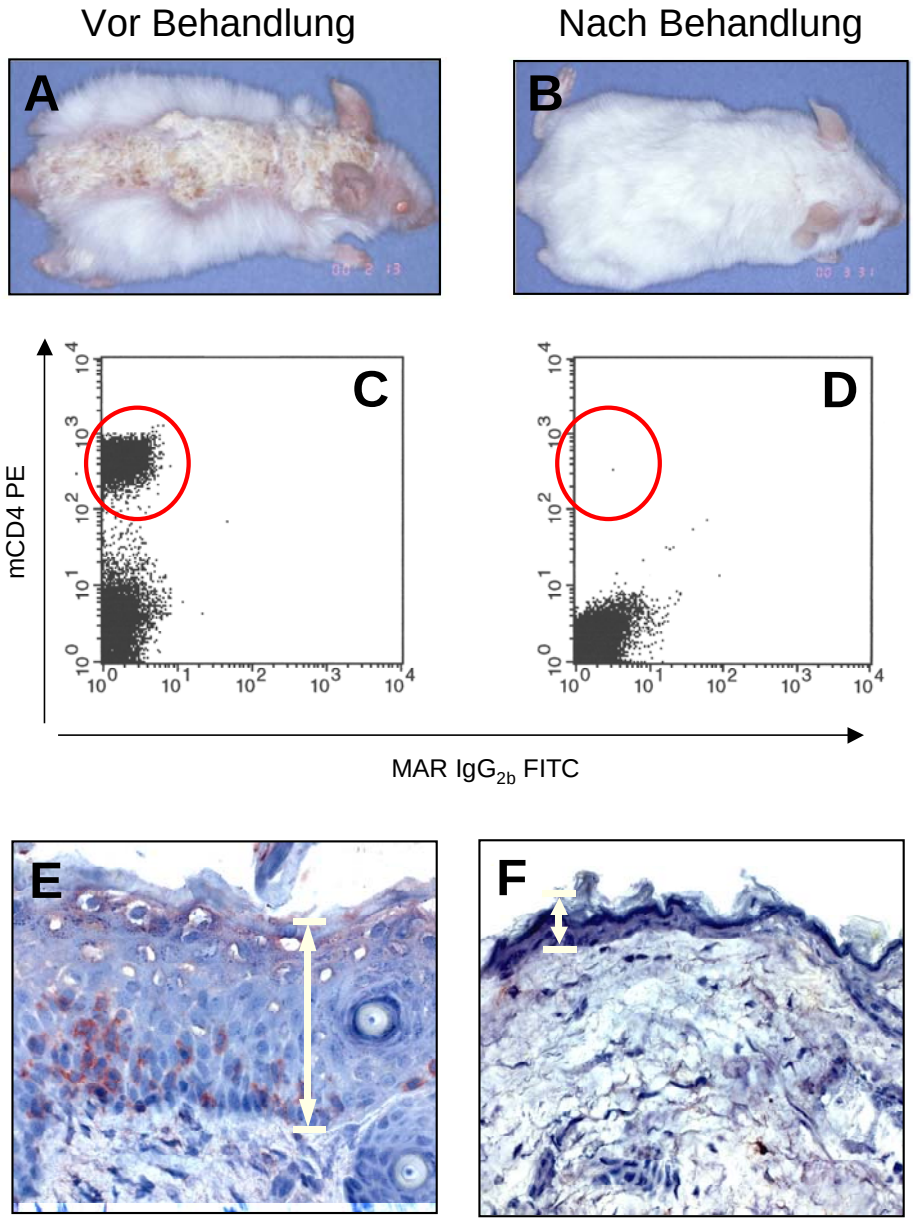


Abb. 16 *In vivo-Depletion von CD4$^+$ T-Zellen führt zur Abheilung der psoriasiformen Dermatitis von CD18^{hypo} PL/J-Mäusen.*
Um den klinischen Effekt der CD4$^+$ T-Zelldepletion zu untersuchen, wurden zweimal pro Woche anti-CD4 mAk in einer Dosis von 100 - 150 µg intraperitoneal injiziert. (*A*) zeigt eine CD18^{hypo} Maus mit einer schweren psoriasiformen Dermatitis. (*B*) zeigt die gleiche Maus nach sechs Wochen Behandlung mit CD4$^+$ T-Zell-depletierenden mAk. Die Depletionseffizienz wurde durch FACS-Analyse der peripheren Blutzellen von CD18^{hypo} Mäusen beurteilt, die entweder mit Isotyp-Kontroll-mAk (*C*) oder CD4$^+$ T-Zell-depletierenden mAk (*D*) behandelt wurden. Mit dem Fluorochrom FITC markierte Maus anti-Ratte (MAR) IgG$_{2b}$ mAk wurden zur Detektion von Resten des Ratte anti-Maus (mCD4) mAk, die zur Depletion der CD4$^+$ T-Zellen verwendet wurden, eingesetzt. Der rote Kreis hebt die CD4$^+$ T-Zellpopulation hervor. Hautschnitte von CD18^{hypo} Mäusen, die mit Isotyp-Kontroll-mAk (*E*) oder CD4$^+$ T-Zell-depletierenden mAk (*F*) behandelt wurden, wurden mit mCD4 mAk immunhistologisch gefärbt (ursprüngliche Vergrößerung, x400). Die Pfeile markieren die komplette Dicke der Mausepidermis vom Stratum corneum bis zur Basalschicht.

Auslösung der Komplementkaskade, an der mehr als 15 Proteine beteiligt sind. Als letzter Schritt dieser Kaskade wird die Membran der Zelle, an die die Antikörper gebunden haben, durchlöchert, was zur Lyse und Zerstörung der Zelle führt. Zur Kontrolle wurden $CD18^{hypo}$ Mäuse mit einem dem Isotyp entsprechenden Kontrollantikörper behandelt.

Um die Effizienz der Depletion im Verlauf der Behandlung zu überprüfen, wurden PBMC mit einem anti-CD4 mAk, der gegen ein anderes Epitop als der depletierende mAk gerichtet war (H129.19), und einem Maus anti-Ratte mAk, der Ratten IgG_{2b} detektiert (MAR IgG_{2b}), gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dadurch konnten $CD4^+$ T-Zellen und die sie depletierenden beziehungsweise die Isotyp-Kontroll-mAk, beides Ratten-Immunglobuline vom Typ IgG_{2b}, gleichzeitig bestimmt werden. Mit Isotyp-Kontrollantikörpern behandelte Mäuse zeigten eine deutlich nachweisbare $CD4^+$ T-Zellpopulation (Abb. 16*C*), während die intraperitoneale Verabreichung des anti-CD4 mAk zu einer über 95 %-igen Verminderung der $CD4^+$ T-Zellen führte (Abb. 16*D*). Die injizierten mAk waren in beiden Fällen nicht auf den PBMC zu detektieren. Die Abwesenheit von doppelt positiven Zellen für Maus-CD4 und Ratten-IgG_{2b} belegte, dass der anti-CD4 mAk die $CD4^+$ T-Zellen depletierte und nicht nur neutralisierte. Die Verminderung der $CD4^+$ T-Zellen im Blut wurde regelmäßig im Abstand von zwei Wochen kontrolliert und blieb über den Behandlungszeitraum konstant.

Zusätzlich wurde die Depletionseffizienz in der Haut überprüft. Hautbiopsien wurden mit einem gegen CD4 gerichteten mAk immunhistologisch gefärbt. Verabreichung des Isotyp-Kontroll-mAk zeigte keinen Effekt auf die Anzahl der $CD4^+$ T-Zellen in den psoriasiformen Hautläsionen (Abb. 16*E*). Im Gegensatz dazu wurden $CD4^+$ T-Zellen aus der Haut entfernt, wenn anti-CD4 mAk injiziert wurden (Abb. 16*F*). Die Epidermis, die als hervorstechendes histologisches Merkmal der psoriasiformen Hautkrankheit in den Isotyp-Kontrollen stark verdickt war (Abb. 16*E*), war nach Entfernen der $CD4^+$ T-Zellen auf die Dicke in gesunden Wildtyp-Tieren vermindert (Abb. 16*F*). Dies war auf histologischer Ebene der Beleg, dass die Depletion von $CD4^+$ T-Zellen zu einer Abheilung der psoriasiformen Dermatitis in $CD18^{hypo}$ Mäusen führte. Eine komplette Abheilung der psoriasiformen Dermatitis konnte nach sechs Wochen Behandlung auch anhand des Phänotyps festgestellt werden. Während die Tiere zuvor einen schweren Psoriasis-Phänotyp einschließlich ausgedehnter Schuppung und Haarverlust aufwiesen (n = 3; Abb. 16*A*), waren die Symptome nach Behandlung mit anti-CD4 mAk nicht mehr vorhanden (Abb. 16*B*). Der Effekt der Behandlung mit $CD4^+$ T-Zell-depletierenden mAk wurde anhand des Schweregrades der klinischen Symptome festgestellt, die durch einen adaptierten PASI-Score (siehe 2.2.1.3.2.) beurteilt wurden. Bei zwei Mäusen reduzierte sich der adaptierte PASI-Score nach Behandlung von 10 auf 1,

während für ein weiteres Tier eine Abnahme von 8 auf 2 beobachtet wurde (Abb. 17*A*). Bei allen drei Mäusen, die mit anti-CD4 mAk behandelt wurden, entsprach dies einer nahezu vollständigen Abheilung der psoriasiformen Erkrankung. Die niedrigen adaptierten PASI-Scores blieben über den kompletten Beobachtungszeitraum von sechs Monaten nach der letzten anti-CD4 mAk Injektion konstant. Drei $CD18^{hypo}$ Mäuse, die mit Isotyp-Kontroll-mAk behandelt wurden, zeigten durch die Behandlung keine signifikanten Veränderungen im Phänotyp. Bei zwei Mäusen blieb der adaptierte PASI-Score unverändert bei einem Wert von 8 beziehungsweise 9 und nahm lediglich für eine Maus von 8 auf 7 ab. Dies bestätigte, dass die Abheilung der psoriasiformen Dermatitis durch die Verabreichung des anti-CD4 mAk auf der Depletion der $CD4^+$ T-Zellen und nicht auf unspezifischen Effekten des Ratten-Immunglobulins beruhte.

Übereinstimmende Ergebnisse ergab die Bestimmung der Ohrdicke vor und nach Behandlung als klinisches Maß für den Schweregrad der Hautentzündung. In Mäusen, die mit anti-CD4 mAk behandelt wurden, nahm die Ohrdicke, die als Mittelwert für die drei Tiere ermittelt wurde, von 0,62 auf 0,58 mm ab, was auf eine verminderte Entzündung hinwies, während die Ohrdicke bei den Kontrollmäusen von 0,62 mm vor der Behandlung auf 0,69 mm danach sogar anstieg.

3.4.2. Keine Auswirkung der Depletion von $CD8^+$ T-Zellen auf den psoriasiformen Phänotyp

Da $CD4^+$ T-Zellen ihre Wirkung über die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen ausüben können und $CD8^+$ T-Zellen in der Haut von $CD18^{hypo}$ Mäusen stark vermehrt waren (siehe 3.3.2.), wurden $CD18^{hypo}$ Mäuse mit $CD8^+$ T-Zell-depletierenden mAk behandelt. Zur Kontrolle wurde $CD18^{hypo}$ Mäusen ein Ratten-Immunglobulin vom Typ IgG_{2a} injiziert. Analog zu den Antikörpern vom Typ IgG_{2b}, die bei der $CD4^+$ T-Zell-Depletion als Isotyp-Kontroll-mAk eingesetzt wurden (Abb. 17*A*), bewirkten auch diese Kontroll-mAk keine signifikanten Veränderungen im Phänotyp der $CD18^{hypo}$ Mäuse (Abb. 17*B*). Bei zwei Mäusen blieb der adaptierte PASI-Score unverändert bei einem Wert von 8 beziehungsweise 9 und nahm für eine Maus von 6 auf 7 zu. Aber auch bei Verabreichung der $CD8^+$ T-Zell-depletierenden mAk kam es nicht zu einer Verbesserung der psoriasiformen Dermatitis. Bei zwei mit anti-CD8 mAk behandelten $CD18^{hypo}$ Mäusen blieb der adaptierte PASI-Score konstant bei einem Wert von 7 beziehungsweise 8 und stieg für eine Maus sogar von 7 auf 9 an. Dies ging einher mit

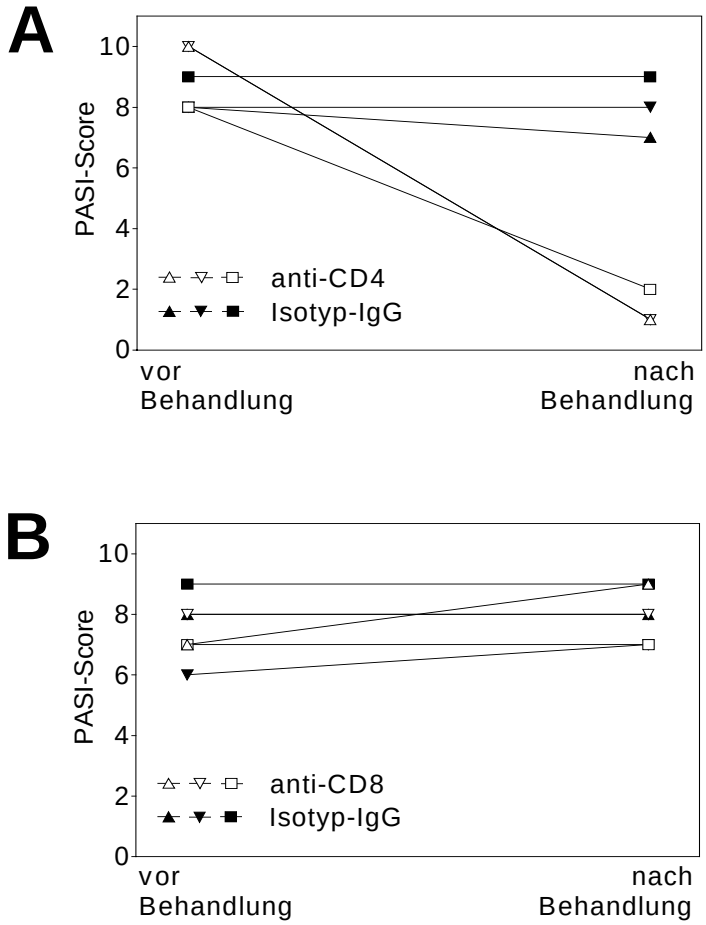


Abb. 17 *Depletion von CD4$^+$, nicht aber CD8$^+$ T-Zellen führt zu einer starken Verbesserung des klinischen Zustands von CD18^{hypo} Mäusen.*
Um den Schweregrad des psoriasiformen Phänotyps der CD18^{hypo} Mäuse vor und nach Behandlung mit T-Zell-depletierenden-mAk (weiße Symbole) beziehungsweise Isotyp-Kontroll-mAk (schwarze Symbole) zu bestimmen, wurde ein adaptierter PASI-Score verwendet. Mit diesem wurden die klinischen Symptome Erythem, Haarverlust und Schuppung beurteilt. (*A*) zeigt den PASI-Score vor und nach Depletion der CD4$^+$ T-Zellen, (*B*) den PASI-Score vor und nach Depletion der CD8$^+$ T-Zellen.

einem leichten Anstieg der Ohrdicke von 0,72 mm vor auf 0,75 mm nach Behandlung, was auf ein Anhalten der Hautentzündung hindeutete. Gleiches traf für die mit Isotyp-mAk behandelten Kontrollmäuse zu, deren Ohrdicke konstant bei einem Wert von 0,59 mm blieb. Obwohl keine klinischen Auswirkungen festgestellt werden konnten, waren die CD8$^+$ T-Zellen im Vergleich zu mit Isotyp-Kontroll-mAk behandelten Tieren (Abb. 18*A*) vollständig aus der Haut der CD18^{hypo} Mäuse entfernt worden (Abb. 18*B*). Diese Beobachtung bestätigte, dass die Konzentration an anti-CD8 mAk ausreichend hoch gewählt war. Die Histologien, in denen Hautschnitte mit einem mAk gegen CD8 gefärbt wurden, zeigten zwar keine CD8$^+$ T-Zellen, wiesen jedoch mit Akanthose, Hyper- und Parakeratose sowie einem ausgeprägten dermalen entzündlichen Infiltrat sonst alle Kriterien der Psoriasis auf. Sowohl in Kontroll-

mäusen (Abb. 18*A*) als auch in mit $CD8^+$ T-Zell-depletierenden mAk behandelten Tieren (Abb. 18*B*) zeigten sich entsprechende Veränderungen, die auf das Anhalten der psoriasiformen Erkrankung hinwiesen.

Die Effizienz der Depletion wurde durch die FACS-Analyse bestätigt, in der sowohl $CD8^+$ T-Zellen als auch die sie depletierenden beziehungsweise Isotyp-Kontroll-mAk, beides Ratten-Immunglobuline vom Typ IgG_{2a}, gleichzeitig detektiert wurden. Die Anzahl an $CD8^+$ T-Zellen im peripheren Blut der Tiere, denen gegen CD8 gerichtete mAk verabreicht wurden, waren im Vergleich zu Tieren, die mit Isotyp-Kontroll-mAk behandelt wurden und eine

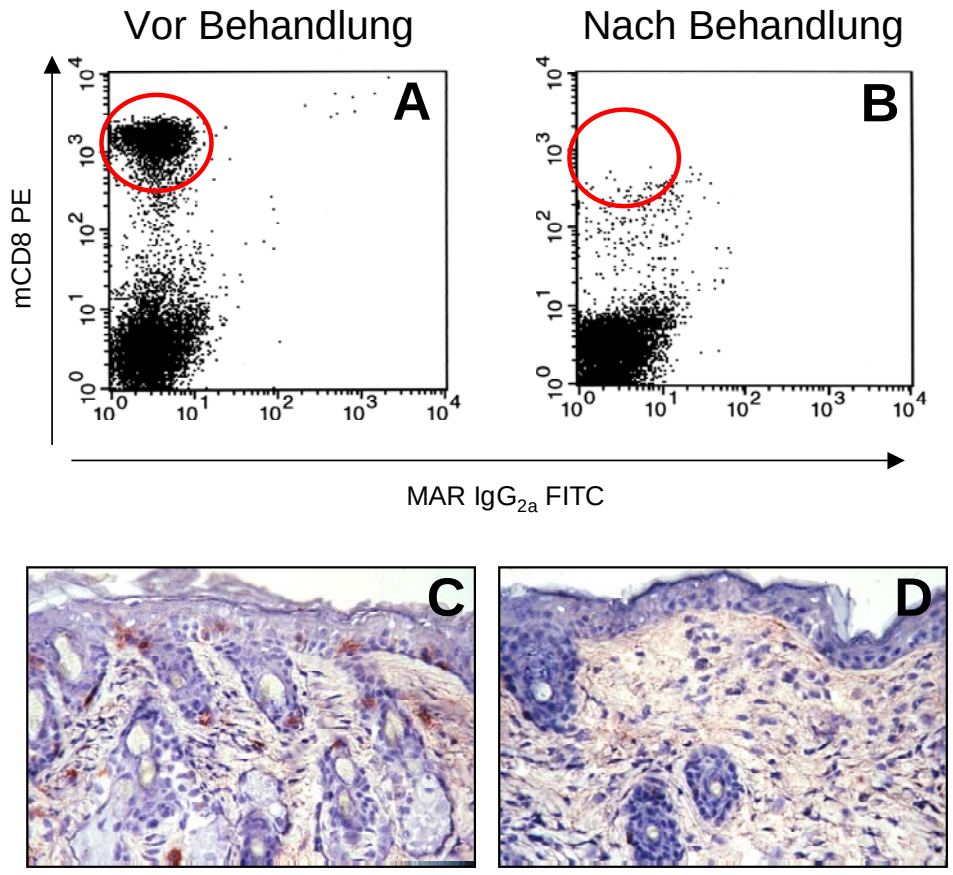


Abb. 18 *Injektion des anti-CD8 mAk führt zur Depletion von $CD8^+$ T-Zellen in $CD18^{hypo}$ Mäusen.*
Um den klinischen Effekt der $CD8^+$ T-Zelldepletion zu untersuchen, wurden zweimal pro Woche anti-CD8 mAk in einer Dosis von 100 – 150 µg intraperitoneal injiziert. Die Depletionseffizienz wurde durch FACS-Analyse der peripheren Blutzellen von $CD18^{hypo}$ Mäusen beurteilt, die entweder mit Isotyp-Kontroll-mAk (*A*) oder $CD8^+$ T-Zell-depletierenden mAk (*B*) behandelt wurden. Mit dem Fluorochrom FITC markierte Maus anti-Ratte (MAR) IgG_{2a} mAk wurden zur Detektion von verbliebenen Ratte anti-Maus (mCD8) mAk, die zur Depletion der $CD8^+$ T-Zellen verwendet wurden, eingesetzt. Der rote Kreis hebt die $CD8^+$ T-Zellpopulation hervor. Hautschnitte von $CD18^{hypo}$ Mäusen, die mit Isotyp-Kontroll-mAk (*C*) oder $CD8^+$ T-Zell-depletierenden mAk (*D*) behandelt wurden, wurden mit mCD8 mAk immunhistologisch gefärbt (ursprüngliche Vergrößerung, x400). Die Pfeile markieren die komplette Breite der Mausepidermis vom Stratum corneum bis zur Basalschicht.

auffällige $CD8^+$ T-Zellpopulation besaßen (Abb. 18*C*), um 90 % reduziert (Abb. 18*D*). Entsprechend der $CD4^+$ T-Zell-Depletion konnte auch in mit anti-CD8 mAk behandelten Tieren der injizierte mAk nicht auf den Zellen des peripheren Blutes detektiert werden. Dies belegte, dass auch die $CD8^+$ T-Zellen depletiert und nicht nur neutralisiert wurden.

3.5. Kein psoriasiformer Phänotyp bei $CD18^{null}$ Mäusen

Für die Untersuchung, ob das komplette Fehlen von CD18 gleichermaßen zu der Ausbildung eines psoriasiformen Phänotyps bei Mäusen des PL/J-Stammes führte, stand eine PL/J-Mauslinie mit vollständiger CD18-Defizienz ($CD18^{null}$) zur Verfügung. PL/J $CD18^{null}$ Mutanten (n = 200) entwickelten während einer Beobachtungsperiode von mehr als zwei Jahren keinerlei psoriasiforme Hauterkrankung (Abb. 19). Auffällig ist lediglich eine Atrophie beziehungsweise Minderwuchs, deren beziehungsweise dessen molekulare Ursache nicht bekannt ist.

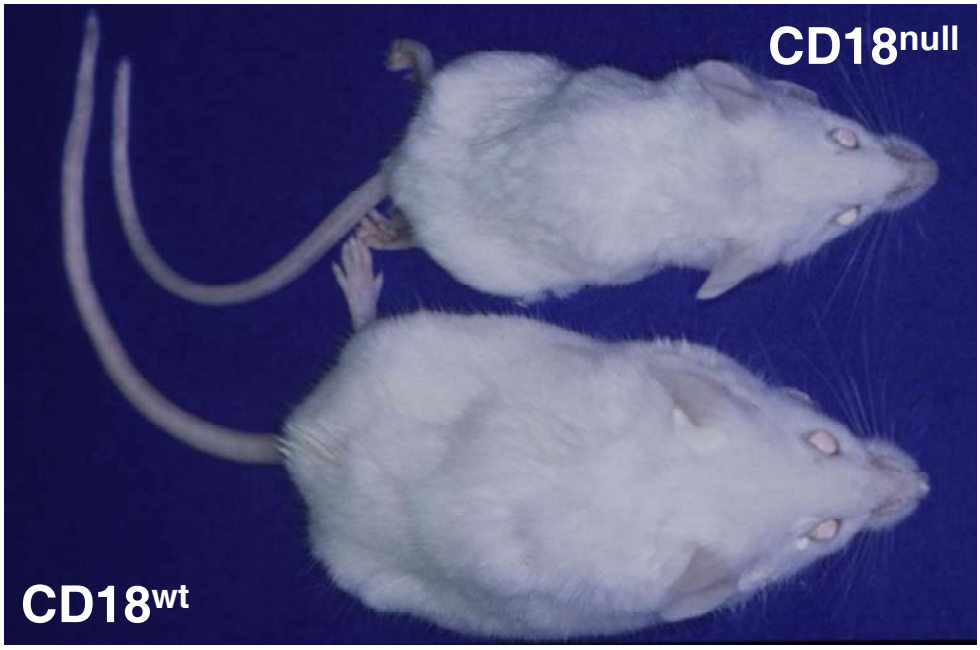


Abb. 19 *$CD18^{null}$ sind kleiner als $CD18^{wt}$ PL/J-Mäuse, zeigen aber keinen psoriasiformen Phänotyp.*
Um zu untersuchen, ob das komplette Fehlen von CD18 zur Ausbildung einer psoriasiformen Dermatitis bei PL/J-Mäusen führt, wurden Tiere untersucht, bei denen die CD18-Nullmutation auf den PL/J-Stamm rückgekreuzt war. Gezeigt ist eine $CD18^{null}$ Mutante (oben) neben einer $CD18^{wt}$ Maus (unten).

3.6. Gestörtes Auswandern von T-Zellen als möglicher Grund für die Abwesenheit eines psoriasiformen Phänotyps bei $CD18^{null}$ Mäusen

Die Abwesenheit eines psoriasiformen Phänotyps bei $CD18^{null}$ Mutanten könnte auf einer fehlenden Auswanderung von T-Zellen aus Blutgefäßen beruhen (Grabbe et al. 2002). Da angenommen wird, dass Antigen-spezifische T-Zellen in der Pathogenese der Psoriasis eine zentrale Rolle spielen, und ein verantwortliches Antigen noch nicht identifiziert werden konnte (Lin et al. 2001, Prinz 2001), war es schwierig, die Auswanderungskinetik Antigen-spezifischer T-Zellen zu untersuchen. Mittels eines allergischen Kontaktdermatitis-Modells wurde eine T-Zell-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion vom Typ IV (klassifiziert nach Gell und Coombs 1963) unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, wobei in diesem Fall Oxazolon als definiertes Antigen fungierte.

3.6.1. Auslösung einer allergischen Kontaktdermatitis in $CD18^{wt}$ und $CD18^{hypo}$, nicht aber in $CD18^{null}$ Mäusen

Die T-Zell-abhängigen entzündlichen Reaktionen von $CD18^{wt}$, $CD18^{hypo}$ und $CD18^{null}$ Mäusen des PL/J-Stammes nach Induktion einer allergischen Kontaktdermatitis wurden verglichen. Hierzu wurden Mäuse zunächst am Bauch mit Oxazolon sensibilisiert und fünf Tage später erneut mit Oxazolon, das auf die Ohren der Tiere aufgetragen wurde, in Kontakt gebracht (siehe 2.2.8.). Die entzündliche Reaktion wurde in Form der Ohrschwellung gemessen. Um zwischen der induzierten allergischen Kontaktdermatitis und der spontan auftretenden psoriasiformen Dermatitis bei $CD18^{hypo}$ PL/J Mäusen unterscheiden zu können, wurden nur klinisch gesunde $CD18^{hypo}$ Mäuse analysiert, bei denen die sich später entwickelnde psoriasiforme Dermatitis noch nicht vorhanden war. Diese Mäuse wurden mit gleich behandelten $CD18^{wt}$ und $CD18^{null}$ Mäusen als Kontrollen verglichen. Durch das Aufbringen von Oxazolon auf die Ohren sensibilisierter Tiere konnte eine allergische Kontaktdermatitis bei $CD18^{hypo}$ und $CD18^{wt}$ Mäusen, nicht aber bei $CD18^{null}$ Mutanten ausgelöst werden (Abb. 20). Bereits zu den frühen Zeitpunkten nach 3 h und 6 h konnte eine Ohrschwellung in den $CD18^{wt}$ Mäusen beobachtet werden. Die Ohrdicke dieser Tiere stieg im Mittelwert (n = 6) um 112 beziehungsweise 187 µm gegenüber der Ohrdicke vor Beginn der Behandlung an. Für ebenfalls je 6 $CD18^{hypo}$ und $CD18^{null}$ Mäuse betrug die Zunahme der Ohrdicke 33 und 12 µm nach 3 h beziehungsweise 38 und 17 µm nach 6 h. Zwar zeigten die $CD18^{hypo}$ gegenüber den $CD18^{null}$

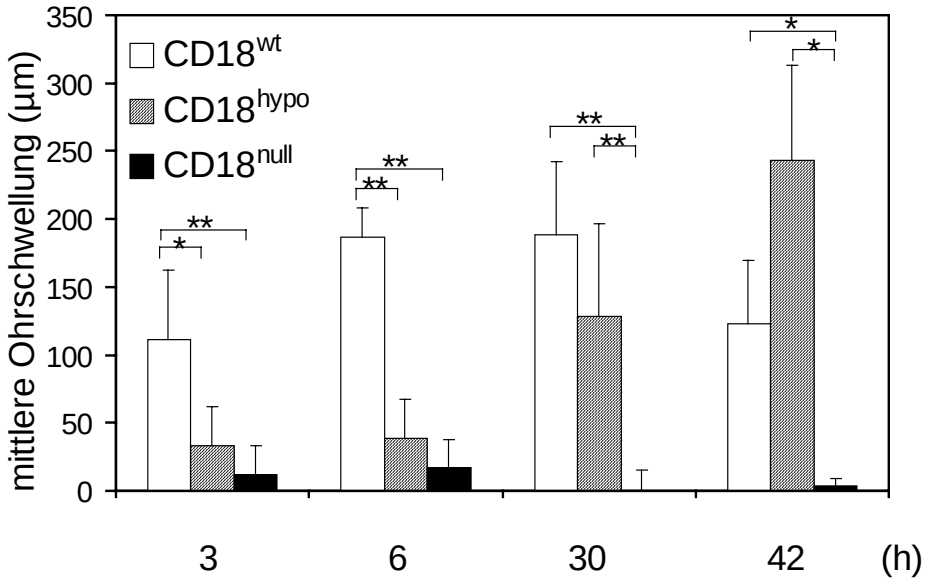


Abb. 20 *Eine allergische Kontaktdermatitis lässt sich nach Reizung mit Oxazolon in CD18^{hypo} und CD18^{wt}, nicht aber CD18^{null} Mäusen auslösen.*
Junge CD18^{hypo} Mäuse im Alter von 6 - 12 Wochen wurden verwendet, die noch keine Anzeichen der später auftretenden psoriasiformen Dermatitis zeigten. Alle Mäuse wurden mit 2 % Oxazolon sensibilisiert und nach fünf Tagen eine allergische Kontaktdermatitis durch Aufbringen von 0,5 % Oxazolon ausgelöst. Die mittlere Ohrschwellung von CD18^{wt} (weiße Balken), CD18^{hypo} (gestreifte Balken) und CD18^{null} Mäusen (schwarze Balken) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Reizung mit Oxazolon gemessen (n ≥ 3). Die Ohrschwellung wurde durch Subtraktion der Ohrdicken vor und nach Behandlung berechnet. (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$; p = nicht signifikant für alle anderen Gruppen.

Tieren zu beiden Zeitpunkten eine stärkere Ohrschwellung, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (Welch´s *t*-Test, $p > 0,16$). Dagegen war der Unterschied zu den CD18^{wt} Mäusen für beide Gruppen sowohl nach 3 h als auch nach 6 h signifikant ($p < 0,01$ beziehungsweise $p < 0,05$). Zu den späteren Zeitpunkten nach 30 h (n = 6) und 42 h (n = 3) stieg die Ohrdicke der CD18^{hypo} Tiere stark an. Die Zunahme der Ohrdicke betrug 128 µm nach 30 h und 243 µm nach 42 h. Zu beiden Zeitpunkten konnte kein signifikanter Unterschied zu CD18^{wt} Mäusen festgestellt werden ($p > 0,10$), obwohl bei diesen die Ohrschwellung von 188 µm nach 30 h auf 123 µm nach 42 h zurückging. Dagegen unterschieden sich sowohl CD18^{hypo} als auch CD18^{wt} Mäuse nach 30 h ($p < 0,01$) beziehungsweise 42 h ($p < 0,05$) signifikant im Anstieg der Ohrdicke gegenüber CD18^{null} Tieren. Bei letztgenannten war zu beiden Zeitpunkten kein Unterschied zur Ohrdicke vor Beginn der Behandlung vorhanden. Zusammengefasst ergab sich, dass mittels Oxazolon eine allergische Kontaktdermatitis bei CD18^{hypo} Mäusen ausgelöst werden konnte, die gegenüber CD18^{wt} Mäusen mit leichter Verzögerung einsetzte. Während bei CD18^{wt} Tieren die Ohrschwellung nach 42 h zurückging, stieg die Ohrdicke bei

CD18^{hypo} Mäusen weiter an. Bei CD18^{null} Mutanten ließ sich dagegen keine T-Zell-vermittelte Immunreaktion auslösen.

3.6.2. Auswanderung von T-Zellen nach Auslösen einer allergischen Kontaktdermatitis in die Haut von CD18^{wt} und CD18^{hypo}, nicht aber von CD18^{null} Mäusen

Die Schwellung der Oxazolon-behandelten Ohren könnte verschiedene Ursachen haben. Sie könnte zum einen auf einer T-Zell-vermittelten Immunreaktion beruhen. In diesem Fall wäre ein starkes Infiltrat entzündlicher Zellen im Gewebe vorhanden. Zum anderen könnte die Ohrschwellung ein unspezifisches Ödem, hervorgerufen durch eine Ansammlung wässriger Flüssigkeit, widerspiegeln. Um dies zu unterscheiden, wurden die Ohren von drei der jeweils sechs CD18^{null}, CD18^{hypo} und CD18^{wt} Mäuse 30 h nach Auftragen des Oxazolons entnommen und histologisch analysiert. Hierbei wiesen die Ohren der CD18^{hypo} Mäuse im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen eine verdickte Epidermis auf, wie sie auch in der Haut von betroffenen CD18^{hypo} Mäusen gefunden wurde (Abb. 10*B*).
HE- (Hämatoxylin/Eosin-) Färbungen (Abb. 21 oben) machten eine deutliche perivaskuläre und diffuse Einwanderung von entzündlichen Zellen, wie auch eine Spongiose (durch entzündliches Ödem bedingte Verbreiterung der interzellulären Zwischenräume) der Epidermis von CD18^{hypo} und CD18^{wt} Mäusen deutlich, was auf eine starke allergische Reaktion gegen Oxazolon hinwies. Dagegen wurde bei CD18^{null} Mutanten lediglich ein leichtes Ödem ohne entzündliche Zellen entdeckt. Die geringe Dicke der Ohren von CD18^{null} Mäusen im Vergleich zu CD18^{hypo} und CD18^{wt} Tieren entsprach den Ergebnissen aus 3.6.1..
Um zu untersuchen, ob das fehlende Auswandern von T-Zellen aus den Gefäßen in das Gewebe ursächlich zu der ausbleibenden Reaktion der CD18^{null} Mutanten auf den Oxazolon-Reiz beitrug, wurden Immunfärbungen mit mAk gegen CD4 (Abb. 21 Mitte) und CD8 (Abb. 21 unten) auf Schnitten der Oxazolon-behandelten Ohren durchgeführt (siehe 2.2.3.2.). Sowohl CD18^{wt} als auch CD18^{hypo} Mäuse zeigten einen deutlichen Anstieg an CD4^{+} und CD8^{+} T-Zellen im Gewebe, während T-Zellen in den Oxazolon-behandelten Ohren von CD18^{null} Mäusen fehlten. 2 - 16 % der CD18-Genexpression waren ausreichend, damit Oxazolon-spezifische T-Zellen aus den Blutgefäßen auswandern und damit die allergische Kontaktdermatitis auslösen konnten. Diese Ergebnisse unterstützen die Schlussfolgerung, dass die pathogene Beteiligung von CD4^{+} T-Zellen an der Hautkrankheit der CD18^{hypo} PL/J-Mäuse auf einem Gendosiseffekt der CD18-Expression beruht.

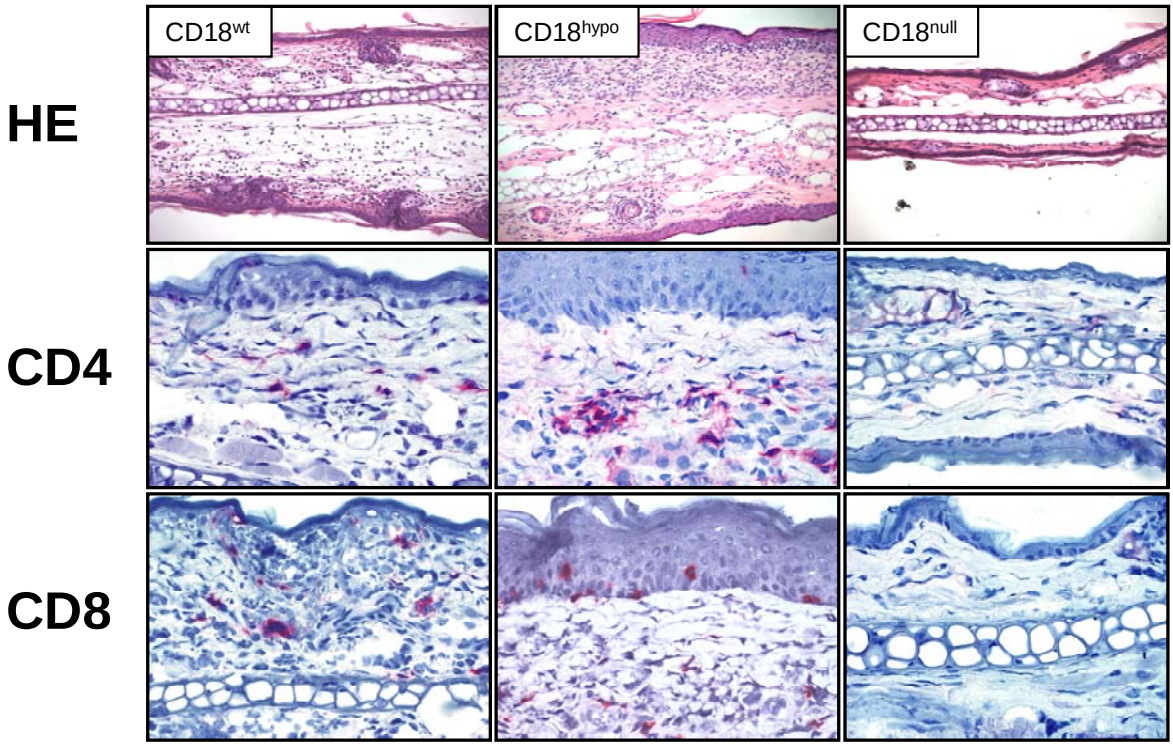


Abb. 21 *T-Zellen sind in Oxazolon-gereizten Ohren von CD18^{hypo} und CD18^{wt}, nicht aber CD18^{null} Mäusen stark vermehrt.*
HE-Histologie (ursprüngliche Vergrößerung, x200) und Immunfärbungen von Ohrschnitten mit mAk, die gegen CD4^{+} und CD8^{+} T-Zellen gerichtet waren. Die Ohren wurden von sensibilisierten CD18^{wt}, CD18^{hypo} und CD18^{null} Mäusen 30 h nach Reizung mit 0,5 % Oxazolon gewonnen. Ein Detektionssystem mit Alkalischer Phophatase wurde benutzt. CD4^{+} beziehungsweise CD8^{+} T-Zellen sind anhand der roten Färbung zu erkennen. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt (blaue Färbung, ursprüngliche Vergrößerung, x400).

3.7. Identifizierung von mit der psoriasiformen Dermatitis in CD18^{hypo} PL/J-Mäusen assoziierten Chromosomenabschnitten

Im Gegensatz zu CD18^{hypo} PL/J-Mäusen, die eine psoriasiforme Erkrankung entwickeln, zeigen C57BL/6J- oder 129/Sv-Mäuse mit der gleichen Mutation keine Anzeichen dieser Hautkrankheit. Rückkreuzungsexperimente zwischen dem suszeptiblen PL/J- und dem resistenten C57BL/6J-Stamm deuteten darauf hin, dass neben der hypomorphen CD18-Mutation nur ein oder zwei weitere Gene die Suszeptibilität für diese polygene Erkrankung bestimmen. Die Chromosomenabschnitte, auf denen sich diese Gene befinden, sollten mittels einer Kopplungsanalyse identifiziert werden.

3.7.1. Entwicklung eines schweren psoriasiformen Phänotyps bei 16 % der Nachkommen aus einer Rückkreuzung zwischen CD18^{hypo} PL/J- und C57BL/6J-Mäusen

Wie unter 2.2.1.2.2. beschrieben, wurden CD18^{hypo} Mäuse des suszeptiblen PL/J-Stammes und des resistenten C57BL/6J-Stammes nach einem Rückkreuzungsschema verpaart. Die Rückkreuzung brachte 343 Mäuse der N2-Generation hervor. Diese wurden mittels des unter 2.2.1.3.1. beschriebenen Beurteilungssystems zweiwöchentlich über einen Zeitraum von bis zu 75 Wochen auf ihren psoriasiformen Phänotyp hin untersucht. Da verschiedene Komponenten der Erkrankung, wie zum Beispiel die Suszeptibilität, der Schweregrad oder das Einsetzen erster Symptome, von unterschiedlichen Genorten beeinflusst werden können, wurden sie als separate Phänotypen (siehe 2.2.1.3.1.) bestimmt. Die ermittelten Phänotypen sind in Tab. 1 zusammengefasst.

61 % der Nachkommen der N2-Generation (n = 209) zeigten keine Anzeichen der psoriasiformen Dermatitis und wurden in den Phänotypen „Susceptibility“ und „Maxscore“ mit dem Wert 0 beurteilt. Von den Mäusen, die suszeptibel für die Erkrankung waren („Susceptibility“ = 1) erreichten 54 einen maximalen Wert des adaptierten PASI-Scores von 1 (16 %) und 24 einen Wert von 2 (7 %). 16 % der Tiere der N2-Generation wiesen einen

"Maxscore"	Anzahl N2-Mäuse (n)	"Sex"		"Susceptibility"	"Onset" Mittelwert	"AUC34" Mittelwert
		Weibchen	Männchen			
0	209	83	126	0 (n = 209)	0	0 (n = 197)
1	54	43	11		13,9	9,6 (n = 50)
2	24	17	7	1 (n = 134)	13,8	13,8 (n = 21)
3	45	30	15		10,7	24,5 (n = 32)
4	11	8	3		6,8	33,3 (n = 11)
Alle	343	181	162			

Tab. 1 *Phänotyp-Beurteilung der Mäuse der N2-Generation.*
Die fünf verschiedenen Phänotypen wurden über einen Zeitraum von bis zu 20 Monaten beobachtet. Hierzu wurde das unter 2.2.1.3.1. beschriebene Beurteilungssystem verwendet. Die Mäuse der N2-Generation wurden nach dem höchsten adaptierten PASI-Score, der für die Maus beobachtet wurde („Maxscore“), eingeteilt und die anderen Phänotypen für die jeweiligen Gruppen betrachtet. Beim Geschlecht („Sex“) unterscheidet man Männchen und Weibchen. Unter „Susceptibility“ wird eine Maus, die suszeptibel für die psoriasiforme Dermatitis ist, mit 1 gekennzeichnet. Zeigt sie dagegen keinerlei Kennzeichen der Erkrankung, erhält sie den Wert 0. Die Anzahl (n) der Mäuse in der jeweiligen Gruppe ist in Klammern angegeben. „Onset“ gibt den Zeitpunkt (in Wochen nach dem Absetzen) an, an dem die ersten Zeichen der Erkrankung auftraten. Ließen sich keine Symptome beobachten, erhielt das Tier den Wert 0. „AUC34“ ist die Summe der adaptierten PASI-Scores, die nach dem Absetzen alle zwei Wochen bis zu 34 Wochen bestimmt wurden. Für Mäuse, die bereits vor diesem Zeitpunkt verstorben waren, konnte dieser Phänotyp nicht ermittelt werden. Daher verringert sich die Anzahl (n) der Mäuse in der jeweiligen Gruppe. Für die Phänotypen „Onset“ und „AUC34“ ist der Mittelwert angegeben.

„Maxscore“ von 3 (n = 45) oder 4 (n = 11) auf. Erste Symptome der psoriasiformen Dermatitis entwickelten sich bei den Mäusen, die einen höheren adaptierten PASI-Score erreichten, früher als bei weniger stark betroffenen Tieren. Die Werte für den Phänotyp „Onset“ lagen für Nachkommen der N2-Generation mit einem „Maxscore“ von 3 beziehungsweise 4 im Durchschnitt bei 11 beziehungsweise 7, während erste Symptome bei Mäusen mit einem „Maxscore“ von 1 beziehungsweise 2 jeweils erst 14 Wochen nach Absetzen der Tiere auftraten. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch signifikant (ANOVA-Test, $p = 0{,}0388$). Der Phänotyp „AUC34“ gibt die Summe der adaptierten PASI-Scores an, die nach dem Absetzen alle zwei Wochen bis zu 34 Wochen bestimmt wurden. Dadurch kann der Verlauf der Erkrankung beurteilt werden. Je früher sich die psoriasiforme Erkrankung entwickelt, je stärker die Mäuse betroffen sind und je länger die Erkrankung anhält, desto höhere Werte erhält man für diesen Phänotyp. Für Nachkommen der N2-Generation mit einem „Maxscore“ von 3 oder 4 lag der „AUC34“ im Durchschnitt bei 25 beziehungsweise 33, wohingegen Mäuse mit einem „Maxscore“ von 1 oder 2 Werte von 10 beziehungsweise 14 aufwiesen. Für 32 Tiere konnte der „AUC34“ nicht bestimmt werden, da sie vor Beendigung des Beobachtungszeitraums von 34 Wochen nach Absetzen verstarben. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch signifikant (ANOVA-Test, $p < 0{,}0001$).
Da das Geschlecht der Tiere die Suszeptibilität für die psoriasiforme Hauterkrankung beeinflussen kann, wurde zwischen Männchen und Weibchen unterschieden. Für jeden der vier Schweregrade der Dermatitis („Maxscore“ = 1 bis 4) war der Anteil der weiblichen Tiere mindestens doppelt so hoch wie der Anteil der Männchen. Insgesamt 73 % der suszeptiblen Mäuse waren Weibchen (n = 98). Dagegen überwogen bei den Tieren, die einen „Maxscore“ von 0 aufwiesen, die Männchen mit einem Anteil von 60 % (n = 126). Dies deutete darauf hin, dass weibliche $CD18^{hypo}$ Mäuse empfänglicher für die psoriasiforme Hauterkrankung waren als ihre männlichen Geschwister.

3.7.2. Auswahl von polymorphen Markern für die genomweite Mikrosatellitenanalyse

Mit der DNA der Tiere aus der Rückkreuzung sollte eine genomweite Mikrosatellitenanalyse durchgeführt werden. Hierzu wurden zunächst Mikrosatellitenmarker ermittelt, die polymorph bezüglich der beiden Mausstämme waren, und aus diesen eine Auswahl getroffen, die folgende Bedingung erfüllte. Die Marker sollten gleichmäßig im Abstand von 20 bis maximal 30 cM über das Genom verteilt sein.

Beim Test der die jeweiligen Mikrosatellitenregionen repräsentierenden Marker auf einen Längenunterschied zwischen den beiden Mausstämmen wurde zunächst die optimale DNA-Konzentration für die PCR ermittelt. Hierbei zeigte sich bei Konzentrationen von 10, 50 oder 100 ng/µl kein entscheidender Unterschied in der Menge der PCR-Produkte, weshalb für die weiteren Experimente eine Konzentration von 10 ng/µl eingesetzt wurde.

Anschließend wurden alle Marker darauf getestet, ob sie Unterschiede in der Fragmentlänge zwischen den $CD18^{hypo}$ PL/J- und C57BL/6J-Mäusen aufwiesen. Hierzu wurden PCR mit der DNA von Mäusen aus der Elterngeneration (alle sechs ♂ des PL/J-Stammes und vier ♀ des C57BL/6J-Stammes) durchgeführt. Aus den polymorphen Markern wurden 83 Marker ausgewählt, die die oben genannten Bedingungen erfüllten (Anhang 2). Diese waren folgendermaßen über die 20 Chromosomen der Maus verteilt: Chr. 1: 8 Marker, Chr. 2: 6, Chr. 3: 4, Chr. 4: 5, Chr. 5: 5, Chr. 6: 3, Chr. 7: 4, Chr. 8: 4, Chr. 9: 5, Chr. 10: 4, Chr. 11: 4, Chr. 12: 3, Chr. 13: 5, Chr. 14: 3, Chr. 15: 4, Chr. 16: 4, Chr. 17: 4, Chr. 18: 2, Chr. 19: 2, Chr. X: 4. Mit diesen Markern wurden die Nachkommen der N2-Generation für die Kopplungsanalyse genotypisiert.

Da der $CD18^{hypo}$ PL/J-Stamm kein Inzuchtstamm ist, wichen die Längen der PCR-Produkte für 16 Marker von den für den Wildtyp PL/J-Stamm bekannten Fragmentlängen ab (in Anhang 2 in Fettschrift hervorgehoben). Diese repräsentierten Chromosomenbereiche, die noch DNA des 129/SvEv-Stammes enthielten, von dem ausgehend die $CD18^{hypo}$ Mutation auf den PL/J-Stamm rückgekreuzt wurde. Für 14 Marker trat das 129/SvEv-Allel zusätzlich zu dem des PL/J-Stammes auf. Für die Marker D6Mit67 und DXMit64 zeigten die $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäuse sogar nur die Fragmentlänge des 129/SvEv-Stammes. Da in der Kopplungsanalyse nur zwischen zwei Stämmen unterschieden werden konnte und die 129/SvEv-Allele nicht im $CD18^{hypo}$ C57BL/6J-Stamm auftraten, wurden sie als PL/J-Allele betrachtet.

Für den Marker D4Mit256 traten auch für die $CD18^{hypo}$ C57BL/6J-Mäuse zwei Fragmentlängen auf, was darauf hinwies, dass es sich bei diesen Tieren ebenfalls nicht um einen reinen Inzuchtstamm handelte.

Auf dem Chromosom 10 gibt es einen Bereich, der keine polymorphen Marker enthält. Die benachbarten polymorphen Marker liegen bei 17 beziehungsweise 62 cM. Dieser Bereich stellt die einzige Lücke von mehr als 30 cM dar.

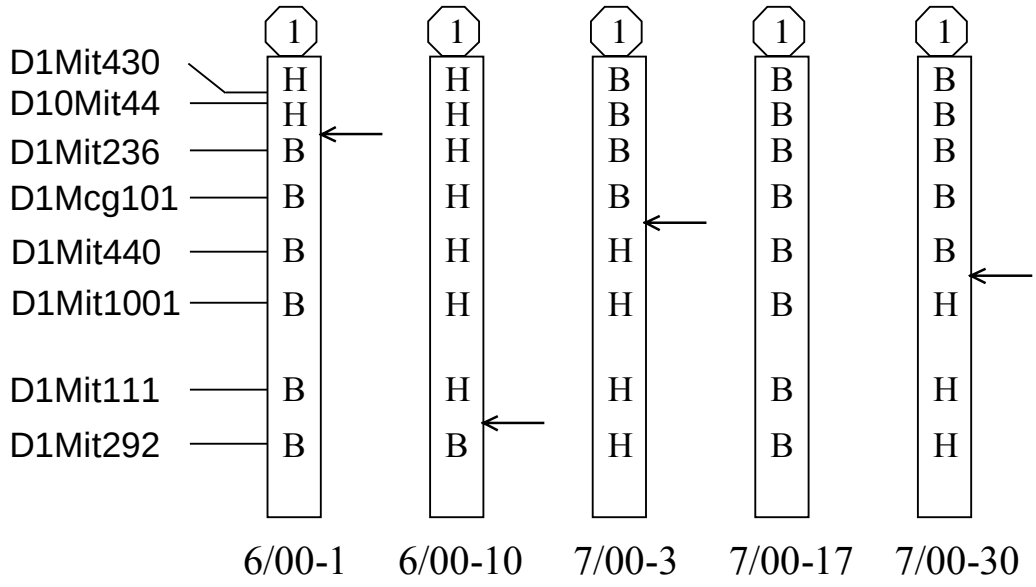


Abb. 22 *Beispiel für das Ergebnis der Genotypisierung.*
94 Mäuse der N2-Generation wurden ausgewählt und mit 83 Mikrosatellitenmarkern (Anhang 2) genotypisiert. Exemplarisch ist das Ergebnis für fünf Mäuse (6/00-1 bis 7/00-30) anhand des Chromosoms 1 dargestellt. Die Positionen der verwendeten Marker ist auf der linken Seite des ersten Chromosoms angegeben. Die in der Mikrosatellitenanalyse ermittelten Genotypen für diese Marker ist für jede einzelne Maus auf dem Chromosom eingetragen. „B“ kennzeichnet Mäuse, die für den jeweiligen Marker nur das Allel für den PL/J-Stamm trugen. „H“ steht für Tiere, für die zusätzlich das C57BL/6J-Allel vorhanden war. Pfeile kennzeichnen Bereiche, in denen eine Rekombination in der mütterlichen Meiose stattgefunden hat.

3.7.3. Stärkste Kopplung mit der psoriasiformen Dermatitis für einen Genort auf Chromosom 10 nach Analyse von 94 Mäusen der N2-Generation

Mit den in Anhang 2 aufgelisteten Markern wurde zunächst eine Auswahl von 94 Mäusen der N2-Generation genotypisiert. Basierend auf den am stärksten entgegengesetzten Phänotypen wurden 53 Mäuse, die für den Phänotyp „Maxscore“ einen Wert von 3 oder 4 zeigten, und 41 Tiere mit einem „Maxscore“ von 0 ausgewählt. Hierbei waren in beiden Gruppen etwa doppelt so viele Weibchen wie Männchen vorhanden. Bei den betroffenen Tieren betrug das Verhältnis 35:18 und bei den nicht betroffenen 26:15. Es konnte für alle Marker der Genotyp jeder einzelnen Maus ermittelt werden. War nur das Allel für den PL/J-Stamm vorhanden, wurde das mit einem „B“ gekennzeichnet. Trat zusätzlich das C57BL/6J-Allel auf, waren die Tiere also heterozygot für diesen Marker, wurde ein „H“ eingetragen. Für das Chromosom X war bei einigen Männchen das C57BL/6J-Allel hemizygot vorhanden. Dies wurde mit einem „A“ gekennzeichnet. Als Beispiel sind die Genotypen der ersten fünf Mäuse für das Chromosom 1 in Abb. 22 dargestellt. Hierbei trug zum Beispiel die Maus 6/00-1 für die Marker

D1Mit430 und D10Mit44 sowohl das PL/J- als auch das C57BL/6J-Allel. Ab dem Marker D1Mit236 war sie dagegen homozygot für das PL/J-Allel. Dies bedeutete, dass bei der Erzeugung dieser Maus eine Rekombination zwischen den Markern D10Mit44 und D1Mit236 in der mütterlichen Meiose stattgefunden hatte. Der Genotyp B trat für alle 83 Marker und 94 Mäuse in 50,9 % der Fälle auf, während die Häufigkeit für die Genotypen H und A zusammen 49,1 % betrug. Dies entsprach der bei einer Rückkreuzung in der N2-Generation zu erwartenden Mendel´schen Verteilung von 50:50.

Um eine Verbindung bestimmter Marker mit der psoriasiformen Erkrankung herauszufinden, wurden die ermittelten Genotypen zusammen mit den Phänotypen der augewählten 94 Mäuse der N2-Generation mit den Programmen Map Manager QTX und R/qtl (siehe 2.2.9.3.) analysiert. Hierbei wurden die Marker für das Chromosom X weggelassen, da bei einigen Mäusen Hemizygotie für das Allel des C57BL/6J-Stammes („A“) auftrat und bei einer Rückkreuzung lediglich Heterozygotie („H“) oder Homozygotie für den Stamm, auf den rückgekreuzt wurde („B“), berücksichtigt werden konnten.

Diese Kopplungsanalyse führte zu dem in Tab. 2 dargestellten Ergebnis, wobei für die einzelnen Chromosomen nur der jeweils höchste LOD-Score, der mindestens den Wert 1 erreichte, aufgelistet ist. Starke Kopplung mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 99 % ergab sich für einen Genort auf Chromosom 10 im Bereich des Markers D10Mit86 für alle Phänotypen und alle Annahmen bezüglich des Geschlechtes. Unter den drei verschiedenen Annahmen erreichten die LOD-Scores dieses Genorts für den Phänotyp „Maxscore“ Werte von 6,9 bis 7,1, für den Phänotyp „Susceptibility“ von 6,3 bis 6,7, für den Phänotyp „Onset“ von 4,6 bis 4,8 und für den Phänotyp „AUC34“ von 4,2 bis 4,3. Diese Werte lagen jeweils über dem mittels der Permutationsanalyse ermittelten Grenzwert, für den die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung mit dem Phänotyp 99 % betrug.

Für den Phänotyp „Onset“ wurde Kopplung mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 99 % für einen Genort auf Chromosom 6 im Bereich des Markers D6Mit67 berechnet, wenn das Geschlecht keine Rolle spielte oder als additive Covariante auftrat. Unter der Annahme, dass das Geschlecht als interaktive Covariante Einfluss nahm, reduzierte sich die Wahrscheinlichkeit auf 90 %. Unter jeder der drei Bedingungen betrug der LOD-Score 3,1 beziehungsweise 3,2, lag aber nur in den beiden erstgenannten Fällen über dem Grenzwert für eine 99 %-ige Wahrscheinlichkeit der Kopplung. Für die gleiche Region auf Chromosom 6 wurden auch für die Phänotypen „Maxscore“ (1,4 - 1,7) und „Susceptibility“ (1,6 – 1,7) LOD-Scores größer als 1 ermittelt, was auf eine mögliche Kopplung hinwies. Allerdings lagen diese Werte unter dem in der Permutationsanalyse ermittelten Grenzwert (2,2 und 2,3 respektive 3,0 für die

unterschiedlichen Annahmen bezüglich des Geschlechtes), für den die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung mit dem Phänotyp 90 % betrug.

Die LOD-Scores für die Chromosomen 6 und 10 sind für die Phänotypen „Maxscore“ und „Onset“ zusätzlich graphisch dargestellt (Abb. 23). Für Chromosom 10 (linke Spalte) liegen die höchsten Werte in einem recht eng begrenzten Bereich zwischen 2 und 18 cM. Der Marker D10Mit86 (5 cM) zeigt hierbei deutlich höhere LOD-Scores als der benachbarte Marker D10Mit213 (0 cM). Zu den Markern D10Mit233 und D10Mit14 (110 cM) fällt die

Annahme / Phänotyp	keine Covariante	Geschlecht als additive Covariante	Geschlecht als interaktive Covariante
Maxscore	D6Mit67 1,5 D10Mit86 6,9 D18Mit194 1,1	D6Mit67 1,4 D10Mit86 7,1 D18Mit194 1,1	D6Mit67 1,7 D10Mit86 7,0 D18Mit194 1,6 D1Mit292 1,8 D4Mit170 1,6
(90%; 95%; 99%)	(2,2; 2,6; 3,5)	(2,3; 2,6; 3,3)	(3,0; 3,4; 4,3)
Onset	D4Mit170 1,3 D6Mit67 3,1 D10Mit86 4,6	D4Mit170 1,2 D6Mit67 3,1 D10Mit86 4,8	D4Mit170 1,8 D6Mit67 3,2 D10Mit86 4,7 D1Mit111 1,3 D9Mit123 1,9 D13Mit13 1,1 D18Mit194 1,8
(90%; 95%; 99%)	(2,2; 2,5; 3,0)	(2,2; 2,5; 3,1)	(2,9; 3,3; 4,3)
Susceptibility	D6Mit67 1,6 D10Mit86 6,3	D6Mit67 1,7 D10Mit86 6,7	D6Mit67 1,6 D10Mit86 6,7 D1Mit292 1,8 D4Mit170 1,6 D9Mit123 1,1 D18Mit194 1,3
(90%; 95%; 99%)	(2,3; 2,7; 3,4)	(2,3; 2,6; 3,6)	(3,0; 3,3; 4,1)
AUC34	D1Mit111 1,1 D10Mit86 4,2 D18Mit194 1,1	D1Mit111 1,1 D10Mit86 4,2 D18Mit194 1,0	D1Mit111 1,3 D10Mit86 4,3 D18Mit194 1,3 D2Mit1 1,4 D4Mit170 1,0 D15Mit252 1,3
(90%; 95%; 99%)	(2,1; 2,4; 3,0)	(2,1; 2,4; 3,0)	(2,9; 3,2; 4,0)

Tab. 2 *Genorte auf Chromosom 10 im Bereich des Markers D10Mit86 und auf Chromosom 6 im Bereich des Markers D6Mit67 zeigen die stärkste Kopplung mit der psoriasiformen Erkrankung von CD18^{hypo} Mäusen.*
Das Ergebnis der ersten Kopplungsanalyse von 94 Mäusen ist dargestellt. Die Berechnungen wurden für die einzelnen unter 2.2.1.3.1. angegebenen Phänotypen durchgeführt, wobei jeder Phänotyp nochmals unter drei verschiedenen Annahmen bezüglich des Geschlechtes betrachtet wurde. Zum einen wurde angenommen, dass das Geschlecht keinen Einfluss ausübte und zum anderen, dass es eine Rolle spielte, wobei wiederum unterschieden wurde, ob es als additive Covariante wirkte oder als interaktive. Angegeben ist für die einzelnen Chromosomen nur der jeweils höchste LOD-Score, der mindestens den Wert 1 erreichte (in den einzelnen Kästchen auf der rechten Seite). Wurde der höchste LOD-Score zwischen zwei Markern ermittelt, wurde der Marker angegeben (in den einzelnen Kästchen auf der linken Seite), der näher an der Region lag. Die für die einzelnen Phänotypen durch Permutationstests berechneten Signifikanzschwellen (90 %; 95 %; 99 %) sind in Klammern angegeben.

Kurve kontinuierlich ab. Die beiden Marker liegen an der gleichen genetischen Position, da zwischen ihnen keine Rekombination in den 94 Mäusen aufgetreten ist. Die LOD-Scores sind über den kompletten Bereich des Chromosoms 10 größer als 2. Für das Chromosom 6 ist der Bereich mit den höchsten LOD-Scores breiter. Er reicht von 18 - 45 cM. Der höchste Wert liegt in der Nähe des Markers D6Mit67 (32 cM). Vor allem für den Phänotyp „Onset“ fällt die Kurve auf beiden Seiten zu den Markern D6Mit274 (0 cM) und D6Mit14 (58 cM) deutlich ab.

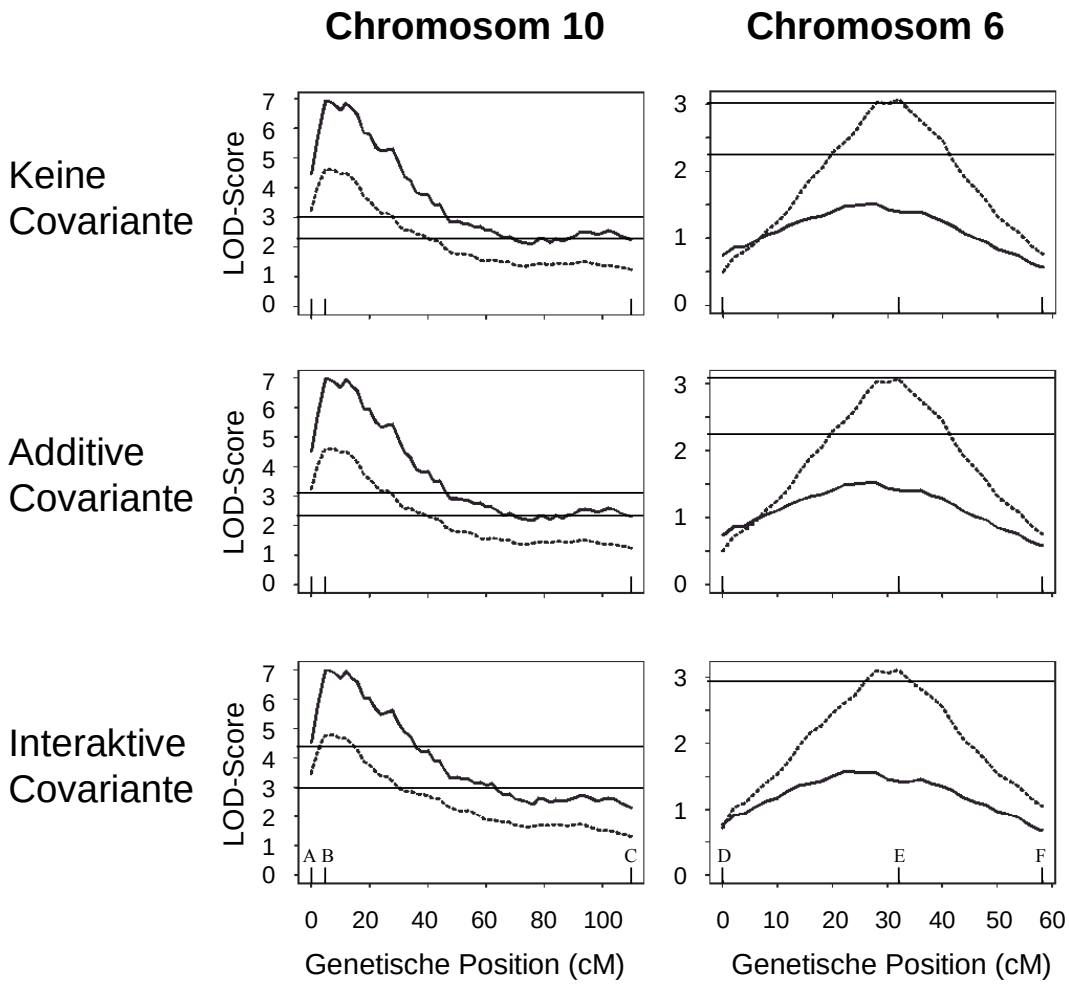


Abb. 23 *Ein Genort auf Chromosom 10 zeigt Kopplung mit den Phänotypen „Maxscore“ und „Onset“, während ein Genort auf Chromosom 6 lediglich mit dem Phänotyp „Onset“ gekoppelt ist.*
Das Ergebnis der Kopplungsanalyse für die Phänotypen „Maxscore“ (durchgezogene Linie) und „Onset“ (gepunktete Linie) unter den drei verschiedenen Annahmen bezüglich der Rolle des Geschlechtes als Covariante ist für die Chromosomen 10 und 6 dargestellt. Aufgetragen sind die LOD-Scores an den jeweiligen genetischen Positionen. Die Positionen der Mikrosatellitenmarker D10Mit213 (A), D10Mit86 (B) und D10Mit233/D10Mit14 (C) beziehungsweise D6Mit274 (D), D6Mit67 (E) und D6Mit14 (F) sind als vertikale Striche auf der X-Achse eingetragen. Die beiden Marker D10Mit233 und D10Mit14 liegen an der gleichen genetischen Position, da zwischen ihnen keine Rekombination in den analysierten Mäusen aufgetreten ist. Die horizontalen Linien kennzeichnen die Signifikanzschwellen für eine Kopplung mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % beziehungsweise 99 %, wobei die für den Phänotyp „Onset“ berechneten Werte verwendet wurden. Für Chromosom 6 unter der Annahme, dass das Geschlecht als interaktive Covariante auftritt, ist lediglich die 90 %-Schwelle eingezeichnet.

Erhöhte LOD-Scores ergaben sich auch für Regionen auf anderen Chromosomen, wobei die LOD-Scores für jeden dieser Genorte unter dem Grenzwert für eine 90 %-ige Wahrscheinlichkeit einer Kopplung lagen (Tab. 2). Bereiche auf den Chromosomen 1, 4 und 18 traten mehrmals für unterschiedliche Phänotypen unter verschiedenen Annahmen bezüglich des Geschlechtes auf. Für die Phänotypen „Maxscore“ und „AUC34“ fand sich unter den drei verschiedenen Bedingungen ein LOD-Score größer als 1 für einen Genort auf Chromosom 18 im Bereich des Markers D18Mit194. Dieser war unter der Annahme, dass das Geschlecht als interaktive Covariante Einfluss nahm, mit Werten von 1,6 beziehungsweise 1,3 am höchsten. Unter den Annahmen, dass das Geschlecht keine oder eine additive Wirkung hatte, lag der LOD-Score bei 1,0 - 1,1. Der Genort im Bereich des Markers D18Mit194 erreichte für die Phänotypen „Onset“ und „Susceptibility“ lediglich unter der Bedingung, dass das Geschlecht eine interaktive Covariante darstellte, mit 1,8 beziehungsweise 1,3 erhöhte LOD-Scores. Unter dieser Annahme bezüglich des Geschlechtes wiesen die Ergebnisse auch auf eine mögliche Kopplung von Genorten auf den Chromosomen 1 und 4 mit jedem der vier Phänotypen hin. Für einen Genort auf Chromosom 1, der sich zwischen den Markern D1Mit111 und D1Mit292 befand, ergaben sich LOD-Scores zwischen 1,3 und 1,8, die manchmal näher an dem einen und manchmal näher an dem anderen Marker lagen. Für einen Genort auf Chromosom 4 im Bereich des Markers D4Mit170 wurden LOD-Scores zwischen 1,0 und 1,8 für die unterschiedlichen Phänotypen ermittelt. Zusätzlich zeigten unter den Annahmen, dass das Geschlecht keine oder eine additive Wirkung hatte, der Genort auf Chromosom 1 mit einem Wert von 1,1 für den Phänotyp „AUC34“ und der Genort auf Chromosom 4 mit einem Wert von 1,2 - 1,3 für den Phänotyp „Onset“ erhöhte LOD-Scores. Genorte auf den Chromosomen 2, 13 und 15 traten nur je einmal und ein Genort auf Chromosom 9 im Bereich des Markers D9Mit123 zweimal auf.

In der Kopplungsanalyse wird anhand der zwischen den Markern auftretenden Rekombinationen die genetische Postition der einzelnen Marker berechnet. Dabei wird dem ersten Marker auf jedem Chromsom die Position 0 cM zugeordnet. Die Marker liegen aber nicht genau am Anfang der Chromosomen. Aus Datenbanken kann man die Postition der Marker und die Länge der Chromosomen erfahren (Anhang 2). Nach Umrechnen in diese bekannten genetischen Positionen liegt der Chromosomenbereich auf Chromosom 10, der die stärkste Kopplung zeigt, zwischen 12 und 28 cM. Auf Chromosom 6 liegt er zwischen 32 und 59 cM, auf Chromosom 18 zwischen 0 und 34 cM, auf Chromosom 1 zwischen 84 und 127 cM und auf Chromosom 4 zwischen 57 und 70 cM (Abb. 24).

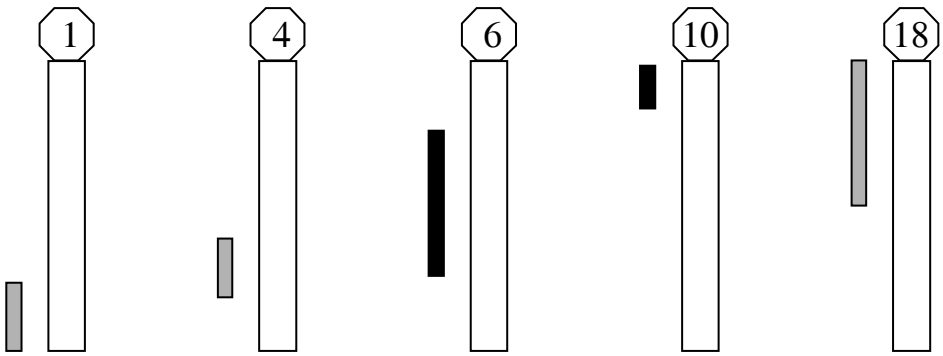


Abb. 24 *Genorte, die mit der psoriasiformen Dermatitis assoziiert oder möglicherweise assoziiert sind, liegen auf den Chromosomen 1, 4, 6, 10 und 18.*
Das Ergebnis der Kopplungsanalyse von 94 Mäusen der N2-Generation, die die am stärksten entgegengesetzten Phänotypen aufwiesen, ist dargestellt. Die Chromosomen und die Bereiche auf ihnen, die Kopplung (schwarze Balken) oder mögliche Kopplung (graue Balken) mit der psoriasiformen Dermatitis zeigten, sind schematisch dargestellt.

3.7.4. Vermehrte Homozygotie für die in der Kopplungsanalyse ermittelten Marker von N2-Mäusen mit einem schweren psoriasiformen Phänotyp gegenüber unbetroffenen Mäusen

Um Aufschlüsse über die Dominanzverhältnisse zwischen den PL/J- und C57BL/6J-Allelen an den jeweiligen Genorten zu erhalten, die Kopplung oder mögliche Kopplung zeigten,

Marker	Betroffene Mäuse (n = 53)		Unbetroffene Mäuse (n = 41)	
	B	H	B	H
D10Mit86	42	11	11	30
D6Mit67	31	22	13	28
D18Mit194	33	20	18	23
D1Mit111/D1Mit292	30/32	23/21	18/22	23/19
D4Mit170	29	24	18	23

Tab. 3 *Für jeden der mit der psoriasiformen Dermatitis gekoppelten Marker ist der Anteil an Homozygoten bei betroffenen gegenüber unbetroffenen Mäusen erhöht.*
Die 94 für die Kopplungsanalyse ausgewählten Mäuse der N2-Generation wurden in Betroffene („Maxscore“ = 3 oder 4) und Unbetroffene („Maxscore“ = 0) aufgeteilt. Die Anzahl der Mäuse, die für den jeweiligen Marker das PL/J-Allel homozygot trugen (B) beziehungsweise heterozygot waren (H) ist aufgeführt. Da sich der Genort auf Chromosom 1, der mögliche Kopplung zeigte, zwischen den Markern D1Mit111 und D1Mit292 befand, wurden die Genotypen für beide Marker verglichen.

wurde untersucht, ob es bei Homozygotie oder Heterozygotie vermehrt zur Entstehung der psoriasiformen Dermatitis kommt. Die Mäuse der N2-Generation wurden in Betroffene und Unbetroffene aufgeteilt und die Genotypen der beiden Gruppen verglichen (Tab. 3). Für jeden der Marker D10Mit86, D6Mit67, D18Mit194, D1Mit111 beziehungsweise D1Mit292 und D4Mit170 gab es unter den erkrankten Mäusen mehr Homozygote für das PL/J-Allel (B) als Heterozygote (H). Mit Ausnahme des Markers D1Mit292 war es bei den Tieren mit einem „Maxscore“ von 0 umgekehrt. Aber auch für D1Mit292 war der Anteil an Homozygoten bei betroffenen gegenüber unbetroffenen Mäusen erhöht. Am deutlichsten war dieser Unterschied für den Marker D10Mit86, der auch in der Kopplungsanalyse die höchsten LOD-Scores zeigte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass jeder der fünf untersuchten Genorte in homozygoter Form stärker zur Auslösung der psoriasiformen Dermatitis beiträgt als im heterozygoten Zustand.

3.7.5. Keine Beeinflussung der Kopplungsanalyse durch die Lücke zwischen den Markern auf Chromosom 10 oder durch die im CD18^{hypo} PL/J-Stamm auftretenden 129/SvEv-Allele

Da bei der Analyse mittels des Programmes R/qtl die Kopplung eines Markers immer auch in Relation zu den benachbarten Markern berechnet wurde, könnte die große Lücke auf Chromosom 10 eventuell Einfluss auf die LOD-Scores der Marker auf diesem Chromosom ausgeübt haben. Um einen solchen Effekt auszuschließen, wurde eine gesonderte statistische Analyse (Mann-Whitney *U*-Test) durchgeführt, in der für die Marker auf Chromosom 10 einzeln die jeweilige Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung mit dem Phänotyp „Maxscore“ bestimmt wurde (Tab. 4). Hierbei konnte das Ergebnis aus der Kopplungsanalyse bestätigt werden. Für alle vier Marker zeigten die Mäuse, die das PL/J-Allel homozygot trugen (B), einen signifikant höheren „Maxscore“ als die heterozygoten Tiere (H), wobei dieser Unterschied für den Marker D10Mit86 am deutlichsten ausgeprägt war ($p < 0{,}0001$). Der Marker D10Mit86 zeigte also, wie in der vorhergegangenen Analyse des gesamten Genoms, eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung mit dem Schweregrad der psoriasiformen Dermatitis.

Um eine Beeinträchtigung der LOD-Score-Berechnung durch die große Lücke auf Chromosom 10 auszuschließen, wurde zusätzlich eine weitere Kopplungsanalyse durchgeführt, bei der das Chromosom 10 für die Computeranalyse in zwei Chromosomen geteilt wurde. Die beiden Marker D10Mit213 (11 cM) und D10Mit86 (17 cM) wurden auf einem Chromosom

verteilt, während die Marker D10Mit233 (62 cM) und D10Mit14 (65 cM) einem anderen Chromosom zugeordnet wurden. Dadurch erhöhte sich die Chromsomenzahl auf 20 und die große Lücke innerhalb des Chromosoms 10 verschwand. Das Ergebnis dieser Kopplungsanalyse entsprach dem vorherigen (Tab. 2) und bestätigte, dass der große Abstand zwischen den Markern D10Mit86 und D10Mit233 die LOD-Score-Berechnung nicht beeinflusst.

Wie unter 3.7.2. beschrieben, trat bei $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen für 14 Marker neben dem Allel des PL/J-Stammes das des 129/SvEv-Stammes auf. Mäuse der N2-Generation können homozygot für eines der Allele oder auch heterozygot sein. Diese unterschiedlichen Genotypen könnten das Ergebnis der Kopplungsanalyse beeinflusst haben. Daher wurde bei den Mäusen für die betreffenden Marker nicht nur zwischen „B“ und „H“ unterschieden (siehe 3.7.3.), sondern diese Genotypen danach unterteilt, ob das PL/J-Allel („B1“ beziehungsweise „H1“), das 129/SvEv-Allel („B2“ beziehungsweise „H2“) oder beide („B12“) vorhanden waren. Die Phänotypen der Tiere wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests (siehe 2.2.10.) auf Unterschiede zwischen diesen fünf Gruppen analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) ergaben sich lediglich für drei der 14 Marker. Bei zweien handelte es sich um die Marker D10Mit233 und D10Mit14 auf Chromosom 10. Der ermittelte Unterschied beruhte nicht auf Differenzen zwischen H1 und H2 beziehungsweise zwischen B1, B2 und B12, sondern zwischen H und B, wie auch schon bei der Analyse mittels des Mann-Whitney *U*-Tests

Marker	Genotyp	Anzahl Mäuse	Mittelwert	Standard-abweichung	Mann Whitney-*U* *p*-Wert
D10Mit213	B H	49 45	2,5 1,1	1,5 1,5	0,0002
D10Mit86	B H	53 41	2,6 0,8	1,4 1,4	< 0,0001
D10Mit233	B H	50 44	2,3 1,2	1,4 1,7	0,0111
D10Mit14	B H	49 45	2,3 1,3	1,4 1,7	0,0266

Tab. 4 *Für jeden Marker auf Chromosom 10 zeigen für das PL/J-Allel homozygote einen gegenüber heterozyoten Mäusen signifikant erhöhten „Maxscore“*.
Die 94 Mäuse der N2-Generation, die für die Kopplungsanalyse ausgewählt wurden, wurden bezüglich der vier verwendeten Marker auf Chromosom 10 in jeweils zwei Gruppen unterteilt. Die Anzahl der Mäuse, die für den jeweiligen Marker das PL/J-Allel homozygot trugen (B) beziehungsweise heterozygot waren (H) ist aufgeführt. Für beide Gruppen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung des Phänotps „Maxscore“ bestimmt und mittels des Mann Whitney-U-Tests die Wahrscheinlichkeit (*p*-Wert) berechnet, dass kein Unterschied zwischen B und H besteht.

festgestellt wurde (Tab. 4). Der dritte Marker, für den ein signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test ermittelt wurde, war D6Mit14 auf Chromosom 6. Auch hier beruhte die Abweichung auf Unterschieden zwischen H und B. Dies bestätigte die Ergebnisse aus der Kopplungsanalyse, bei der für diesen Marker erhöhte LOD-Scores festgestellt wurden, die allerdings niedriger als die für den Marker D6Mit67 waren. Da für keinen der Marker, für die zwei Fragmentlängen auftraten, ein Unterschied zwischen den Mäusen, die das 129/SvEv-Fragment trugen, und solchen, die lediglich das PL/J-Fragment aufwiesen, zu erkennen war, konnten die 129/SvEv-Allele in der Kopplungsanalyse als PL/J-Allele betrachtet werden, ohne das Ergebnis zu beeinträchtigen.

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die psoriasiforme Dermatitis im $CD18^{hypo}$ PL/J-Mausmodell der Psoriasis des Menschen hinsichtlich ihrer immunologischen Komponenten ähnelt. Vergleichbar zu betroffener Haut von Psoriasispatienten sind Makrophagen und T-Zellen auch in der Haut der $CD18^{hypo}$ Mäuse stark vermehrt. $CD4^+$ T-Zellen betroffener Tiere sind aktiviert und wie in der humanen Psoriasis Th1-Zellen vorherrschen, überwiegen auch hier T-Zellen, die Th1-Zytokine produzieren und freisetzen. Ergebnisse aus Depletionsexperimenten deuten darauf hin, dass $CD4^+$ T-Zellen, unabhängig von $CD8^+$ T-Zellen entscheidend an der Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis beteiligt sind. Hierbei scheint ein Gendosiseffekt der CD18-Expression eine zentrale Rolle zu spielen. Im Gegensatz zu $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen entwickeln $CD18^{null}$ Mutanten keinen psoriasiformen Phänotyp. Dies könnte auf einer fehlenden Auswanderung von T-Zellen aus Blutgefäßen in Abwesenheit von CD18 beruhen, während eine CD18-Restexpression von 2 - 16 % für die T-Zell-Emigration ausreicht. Im genetischen Teil dieser Arbeit konnten in einer Kopplungsanalyse Genorte auf den Chromosomen 10 und 6 identifiziert werden, die mit einer mehr als 99 %-igen Wahrscheinlichkeit an der Entstehung der psoriasiformen Hauterkrankung beteiligt sind. Es gab auch Hinweise, dass auf den Chromosomen 1, 4 und 18 weitere Genorte vorhanden sind, die bei der Dermatitis der $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäuse eine Rolle spielen.

4. Diskussion

Die Psoriasis oder Schuppenflechte ist mit einer Verbreitung von durchschnittlich 2 % in der Bevölkerung eine der häufigsten Hauterkrankungen. Die geröteten und von silbrig glänzenden Schuppen bedeckten Hautabschnitte sind histologisch durch Hyperproliferation in der Epidermis und ein ausgeprägtes entzündliches Infiltrat gekennzeichnet. T-Zellen und die durch sie ausgelösten immunologischen Prozesse werden als Ursache der Psoriasis angesehen. Th1-Zellen scheinen hierbei eine zentrale Rolle zu spielen. Die Prozesse, die zur Entstehung der Psoriasis führen, müssen aber noch genauer untersucht werden, um ein besseres Verständnis der Pathomechanismen zu erlangen und effizientere therapeutische Maßnahmen zu entwickeln.

$CD18^{hypo}$ PL/J-Mäuse zeigen eine psoriasiforme Dermatitis, die der Psoriasis des Menschen in vielen Aspekten der Pathogenese stark ähnelt, und könnten somit als Tiermodell zur Aufklärung der pathogenetischen Vorgänge beitragen. Da bei anderen Mausstämmen mit der gleichen $CD18^{hypo}$ Mutation keine Anzeichen der Hauterkrankung auftreten, eignet sich dieses polygene Mausmodell auch dazu, Gene zu identifizieren, die für die Ausprägung des psoriasiformen Phänotyps verantwortlich sind. Diese Gene könnten auch bei der humanen Erkrankung eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das $CD18^{hypo}$ psoriasiforme PL/J-Mausmodell zunächst hinsichtlich seiner Ähnlichkeit zu der Psoriasis des Menschen näher charakterisiert. Die Beteiligung entzündlicher Zellen und besonders die Art und Rolle der T-Zellen in der Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis wurden untersucht. Zudem wurde der Frage nachgegangen, welche Bedeutung die verminderte CD18-Expression für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung hat. Durch eine Rückkreuzung zwischen dem suszeptiblen PL/J- und dem resistenten C57BL/6J-Stamm und anschließende Kopplungsanalysen wurden Chromosomenabschnitte identifiziert, die mit der psoriasiformen Dermatitis assoziierte Gene enthalten.

4.1. $CD4^+$ Th1-Zellen spielen bei der Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis eine entscheidende Rolle

In Übereinstimmung mit der bestehenden Meinung, dass es sich bei der Psoriasis um eine T-Zell-vermittelte immunologische Erkrankung handelt (Krueger 2002), sind T-Zellen auch

für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Hauterkrankung in diesem Mausmodell entscheidend. Die Anzahl an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen - ebenfalls ein Kennzeichen der humanen Psoriasis (Breathnach und Phillips 1996, Valdimarsson et al. 1995) - in der Haut von $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen ist stark erhöht (siehe 3.3.2.). Das Übergewicht von $CD4^+$ im Vergleich zu $CD8^+$ T-Zellen in der Haut von $CD18^{hypo}$ Mäusen mit schwerem psoriasiformem Phänotyp deutet darauf hin, dass $CD4^+$ T-Zellen wesentlich für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Hauterkrankung in diesem Psoriasis-Modell sind. Dies ist analog zu betroffener Haut von Psoriasispatienten, in der $CD4^+$ T-Zellen überwiegen (Breathnach und Phillips 1996, Morel et al. 1992, Thivolet und Nicolas 1994). Die Depletion von $CD4^+$ T-Zellen, nicht aber von $CD8^+$ T-Zellen führt bei $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen zur vollständigen Abheilung der Hauterkrankung (siehe 3.4.). Die Depletionseffizienz wurde durchflusszytometrisch und immunhistologisch bestätigt. Der Effekt einer Depletion von $CD4^+$ T-Zellen stimmt mit der humanen Psoriasis überein, da durch Behandlung mit Antikörpern gegen CD4 psoriatische Läsionen geheilt und der PASI-Score signifikant erniedrigt wird (Bachelez et al. 1998, Gottlieb et al. 2000b, Morel et al. 1992). Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von $CD4^+$ T-Zellen stammt aus Versuchen, bei denen immundefizienten (SCID) Mäusen zunächst unbetroffene Haut von Psoriasispatienten aufgepflanzt und anschließend T-Zellen derselben Patienten injiziert wurden. Lediglich nach Injektion von $CD4^+$, nicht jedoch von $CD8^+$ T-Zellen konnte die Erkrankung in den zunächst unbetroffenen Hautarealen ausgelöst werden (Nickoloff und Wrone-Smith 1999). In betroffenen $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen zeigen nur $CD4^+$, nicht aber $CD8^+$ T-Zellen von Haut-dränierenden Lymphknoten eine gesteigerte IL-2Rα-Expression (siehe 3.3.4.). Da nur $CD4^+$, nicht aber $CD8^+$ T-Zellen dieses Aktivierungsmerkmal aufweisen, scheinen vor allem sie durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) aktiviert zu werden, um anschließend in die Haut zu wandern und eine entzündliche Reaktion zu initiieren. Diese Ergebnisse deuten auf eine zentrale Rolle von $CD4^+$ T-Zellen bei der Pathogenese der psoriasiformen Hauterkrankung von $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen hin.

Dies stützt die Hypothesen von Thivolet und Nicolas (1994) sowie Valdimarsson und Koautoren (1995), die $CD4^+$ T-Zellen als Schlüsselakteure in der Pathogenese der Psoriasis betrachten, während Prinz (1997) und Nickoloff (1999) ein Zusammenspiel von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen als ausschlaggebend für die Entwicklung von psoriatischen Plaques annehmen. Die Untersuchungen zeigen, dass zumindest im $CD18^{hypo}$ PL/J-Mausmodell $CD4^+$ T-Zellen alleine ausreichend sind und eine Kooperation zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zur Aufrechterhaltung der psoriasiformen Erkrankung nicht notwendig ist.

Der Typ von T-Zellen, der in diesem Mausmodell identifiziert wurde, entspricht dem der humanen Psoriasis, die als Th1-Erkrankung angesehen wird (Austin et al. 1999, Schlaak et al. 1994). Im Vergleich zu $CD18^{wt}$ Mäusen setzen stimulierte T-Zellen von betroffenen $CD18^{hypo}$ Mäusen bis zu 30-fach höhere Konzentrationen der Th1-Zytokine IFN-γ und IL-2 frei, wohingegen charakteristische Th2-Zytokine, abgesehen von geringen Mengen an IL-10, nicht nachgewiesen wurden (siehe 3.3.3.1.). Zusätzlich produzierten die $CD18^{hypo}$ T-Zellen beträchtliche Mengen an IL-12 (siehe 3.3.3.2.). Insgesamt wurden auch intrazellulär deutlich höhere Mengen an Th1- im Vergleich zu Th2-Zytokinen gefunden. Dies weist auf ein Vorherrschen von Th1-Zellen in der psoriasiformen Dermatitis von $CD18^{hypo}$ Mäusen hin. Die Verschiebung des Zytokinmusters vom Th1- hin zum Th2-Typ stellte sich als wirksame Strategie in der Therapie von Psoriasispatienten heraus. Tatsächlich wurde die Behandlung mit Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-10 oder IL-11 erfolgreich in klinischen Studien getestet (Asadullah et al. 1999, Ghoreschi et al. 2001, Ghoreschi et al. 2003, Trepicchio et al. 1999). Aber auch das Blockieren von Th1-Zytokinen ist therapeutisch wirksam. Monoklonale Antikörper gegen TNF-α wurden erfolgreich in klinischen Studien getestet (Chaudhari et al. 2001, Mease et al. 2000).

$CD4^+$ T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei einer Vielzahl entzündlicher Prozesse. Sie umfasst nicht nur die Aktivierung zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen, sondern beispielsweise auch die Rekrutierung und Stimulation von Makrophagen. Die Ansammlung zahlreicher Makrophagen bei Psoriasispatienten entlang der Basalmembran zwischen Epidermis und Dermis spricht für eine Rolle dieses Zelltyps bei der Psoriasis (Boehncke et al. 1995, Van den Oord und de Wolf-Peeters 1994). Entsprechend konnte in betroffener Haut von $CD18^{hypo}$ Mäusen eine erhöhte Anzahl an Makrophagen beobachtet werden (siehe 3.3.2.). Diese können stimulierende Effekte auf die Keratinozytenproliferation und die T-Zellaktivierung ausüben (Unutmaz et al 1994, Van den Oord und de Wolf-Peeters 1994). Daher ist es nicht obligatorisch, dass $CD8^+$ T-Zellen am pathogenetischen Prozess teilnehmen. Stattdessen könnten $CD4^+$ T-Zellen andere Zelltypen wie Makrophagen rekrutieren, die alternativ für die Bildung von psoriatischen Plaques verantwortlich sind.

Eines der histologischen Charakteristika der Psoriasis ist ein vermehrtes Vorkommen erweiterter Blutgefäße (Braverman und Sibley 1982). In der Haut von betroffenen $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen sind die Blutgefäße ebenfalls erweitert (Bullard et al. 1996). Sie sind im Vergleich zur Haut von $CD18^{wt}$ Tieren aber nicht vermehrt (siehe 3.3.2.).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die psoriasiforme Dermatitis im $CD18^{hypo}$ Mausmodell der humanen Psoriasis auch hinsichtlich des entzündlichen Infiltrates stark ähnelt

und dass $CD4^+$, nicht aber $CD8^+$ T-Zellen bei der Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen.

4.2. Die CD18-Gendosis ist für die Ausprägung des psoriasiformen Phänotyps entscheidend

Im Gegensatz zu $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen entwickeln Tiere, bei denen die $CD18^{null}$ Mutation sieben Generationen auf den PL/J-Stamm rückgezüchtet wurde, keinen psoriasiformen Phänotyp (siehe 3.5.). Dies wurde auch in einer parallel von Barlow durchgeführten Rückzucht für $CD18^{null}$ Mäuse der N4-Generation gezeigt (Barlow et al. 2003). Dass auch $CD18^{wt}$ PL/J-Mäuse keine entzündliche Erkrankung zeigen weist darauf hin, dass die T-Zell-vermittelte psoriasiforme Hautkrankheit von der CD18-Gendosis und dem Expressionsniveau des CD18-Proteins abhängt. Die $CD18^{hypo}$ Mutation führt zu einer auf 2 – 16 % der Wildtypkontrolle verminderten Expression des CD18-Moleküls und entspricht damit in seiner CD18-Expressionsdichte der milden Form des Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndroms I (LAD1). Die klinische Beobachtung, dass einige LAD1-Patienten, bei denen die CD18-Expression nur geringfügig reduziert ist, eine psoriasiforme Dermatitis entwickeln (Van de Kerkhof und Weemaes 1990), ist ein Indiz, dass eine verminderte CD18-Expression ursächlich bei der Entstehung einer psoriasiformen Dermatitis beteiligt sein könnte. Auch wurde eine verringerte CD11b-Expression auf Leukozyten des peripheren Blutes von Psoriasispatienten festgestellt (Neumüller et al. 2001, Van Pelt et al. 1997).

Durch die reduzierte CD18-Menge unterscheiden sich die exprimierten α-Untereinheiten der β_2-Integrine im Vergleich zu $CD18^{wt}$ Leukozyten lediglich in der Quantität (siehe 3.3.1.). Eine defekte Assoziation zwischen den α- und β_2-Ketten, die durch eine qualitative Veränderung des $CD18^{hypo}$ Moleküls verursacht werden könnte, schien nicht vorzuliegen, da eine fehlende Dimerisierung von β_2-Integrinen zur Internalisierung beider Untereinheiten und zum Verlust der Zelloberflächen-Expression führt (Dimanche 1987, Lisowska-Grospierre 1986). Auch bei Studien mit LAD1-Patienten wurde festgestellt, dass die Defizienz an β_2-Integrin-Heterodimeren eher quantitativer als qualitativer Natur zu sein scheint, da zwei Patienten etwa 0,5 % und ein Patient 5 % der normalen CD18-Menge exprimierte (Ross et al. 1985, Springer et al. 1984). Wie durch Immunpräzipitation festgestellt werden konnte, hatten diese Patienten α/β-Komplexe auf der Zelloberfläche ihrer Leukozyten, die in ihrer absoluten Anzahl reduziert waren, aber ähnliche Verhältnisse zeigten wie gesunde Kontrollen. Die Ergebnisse zur

CD11-Expression von $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen erlauben es allerdings nicht, die Möglichkeit komplett auszuschließen, dass das $CD18^{hypo}$ Genprodukt qualitative Unterschiede zum $CD18^{wt}$ Protein besitzt.

Die Studien zur allergischen Kontaktdermatitis zeigen, dass die verbleibende CD18-Expression für die Auswanderung reaktiver T-Zellen unbedingt nötig ist, während bei $CD18^{null}$ PL/J-Mutanten Antigen-spezifische T-Zellen nicht aus den Blutgefäßen auswandern können (siehe 3.6.). Psoriasis vulgaris wird als Autoimmunerkrankung betrachtet (Breathnach und Phillips 1996, Prinz 1997, Valdimarsson et al. 1995). Diese Sichtweise setzt voraus, dass T-Zellen körpereigene Antigene in der Haut erkennen und eine entzündliche Reaktion auslösen. Wenn T-Zellen nicht fähig sind, in die Haut zu gelangen, wie es durch die $CD18^{null}$ Mutation der Fall ist, kommen sie nicht mit einer größeren Anzahl ihrer spezifischen Autoantigene in Kontakt und könnten daher nicht mehr in der Lage sein, eine entzündliche Reaktion zu starten. Dadurch ließe sich die Abwesenheit eines psoriasiformen Phänotyps bei $CD18^{null}$ PL/J-Mäusen erklären. Tatsächlich wurden nach Auslösen einer allergischen Kontaktdermatitis keine T-Zellen im Ohrgewebe von $CD18^{null}$ Mäusen gefunden (siehe 3.6.2.), was auf eine fehlende T-Zell-Auswanderung aus Blutgefäßen hindeutet. Dies wurde bereits für $CD18^{null}$ Mutanten auf einem anderen genetischen Hintergrund (129/Sv x C57BL/6J) gezeigt (Grabbe et al. 2002). Das Fehlen der T-Zell-Auswanderung scheint daher auf der CD18-Defizienz zu beruhen und nicht vom genetischen Hintergrund abzuhängen.

Dagegen war bei $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäusen nach Auslösen einer allergischen Kontaktdermatitis eine stark erhöhte Anzahl an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Haut vorhanden. Diese war vergleichbar zu der Anzahl bei $CD18^{wt}$ Geschwistern, was darauf hinweist, dass eine CD18-Restexpression von 2 - 16 % für die Auswanderung von T-Zellen aus Gefäßen der Haut in das Gewebe ausreichend ist. Unsere Beobachtungen stimmen mit einer Studie mit 31 Psoriasispatienten überein, die mit verschiedenen Konzentrationen eines humanisierten mAk gegen CD11a, einem Teil des heterodimeren Rezeptors LFA-1 (CD11a/CD18), behandelt wurden. Eine klinische Abheilung der Psoriasis konnte nur durch Verabreichung sättigender Konzentrationen des mAk gegen CD11a erreicht werden, während nicht-sättigende Konzentrationen ineffektiv waren (Gottlieb et al. 2000a). Die Autoren nahmen an, dass eine verminderte T-Zell-Auswanderung bei Fehlen von funktionellem LFA-1 für die Abnahmen in Epidermisdicke, T-Zell-Anzahl und PASI-Score verantwortlich ist. Anhand der CD18-defizienten Mäuse konnte nun der direkte Nachweis erbracht werden, dass die vollständige Verhinderung der T-Zell-Auswanderung die komplette strukturelle oder funktionelle Abwesenheit der β_2-Integrin-Heterodimeren voraussetzt.

Die CD18-Gendosis kann sich aber auch auf andere Zelltypen auswirken, die ebenfalls an der Auslösung der psoriasiformen Dermatitis beteiligt sein könnten. Beispielsweise könnte CD18 die Zytokinfreisetzung von Makrophagen regulieren. Makrophagen der $CD18^{null}$ Mutante produzieren *in vitro* überschießend IL-1, IL-6, TNF-α and IL-12 (Schönlau et al. 2000). Das sind die Zytokine, die in Kombination mit IL-2 an einer Antigen-unabhängigen Stimulation von $CD4^+$ T-Zellen, aber auch an der Differenzierung von T-Zellen zum Th1-Typ beteiligt sind (Unutmaz et al. 1994). In betroffener Haut von Psoriasispatienten kommt es durch erhöhte IL-12-Konzentrationen zum Überwiegen von $CD4^+$ Th1-Zellen (Austin et al. 1999). Eine Kooperation zwischen Makrophagen und T-Zellen könnte zu einer unkontrollierten Entzündungsreaktion führen, die bei $CD18^{hypo}$ Mäusen zur Entstehung der psoriasiformen Dermatitis führt. Auch hierfür wäre die Anwesenheit von T-Zellen in der Haut notwendig, und ein Verhindern ihrer Auswanderung könnte die Entwicklung der Hauterkrankung verhindern.
Da sich bei $CD18^{wt}$ Mäusen mit unbeeinträchtigter T-Zell-Auswanderung keine psoriasiforme Dermatitis entwickelt, sind abgesehen von der Fähigkeit zur ungestörten Auswanderung von T-Zellen zusätzliche pathogene Faktoren, die von der verringerten CD18-Expression abhängen, für die Entwicklung der murinen Psoriasis entscheidend. Unter anderem könnte die reduzierte CD18-Expression die Bildung und das Fortbestehen von autoreaktiven T-Zellen verursachen, beispielsweise durch Störung der normalen Selektion im Thymus.
Tatsächlich wurde von β_2-Integrinen berichtet, dass sie an der intrathymischen T-Zellentwicklung, die mit der positiven und negativen Thymozytenselektion zum Aufbau einer ‚Fremdreaktivität' bei gleichzeitiger Entwicklung einer ‚Eigentoleranz' einen entscheidenden Beitrag leistet, beteiligt sind. LFA-1 (CD11a/CD18) vermittelt die Differenzierung von $CD4^-CD8^-$ zu $CD4^+CD8^+$ Thymozyten (Fine und Kruisbeek 1991) und spielt bei der Regulation der Apoptose während der negativen Selektion von autoreaktiven Thymozyten eine zentrale Rolle (Ferrero et al. 1999, Quddus et al. 1994). Die Rolle von CD18 bei der Lymphozytenaktivierung wurde in sekundären lymphoiden Organen charakterisiert. Während der Immunantwort sind β_2-Integrine für die Einstellung der Antigen-abhängigen Aktivierungsschwellen entscheidend. In Abwesenheit von CD18 ist für eine effiziente T-Zellaktivierung eine 100-fach erhöhte Antigenkonzentration notwendig (Bachmann et al. 1997). Dafür könnten zum Teil strukturelle Defekte, zum Beispiel in immunologischen Synapsen, verantwortlich sein, wie sie bei $CD18^{null}$ Mäusen gefunden werden (Peters et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Ähnliche strukturelle Defekte könnten auch funktionellen Störungen in primären lymphoiden Organen, wie dem Thymus, zugrunde liegen, wenn CD18 verringert ist oder

komplett fehlt. Störungen in der Kommunikation zwischen Antigen-präsentierendem Thymusepithel oder knochenmarksabgeleiteten APC und den reifenden T-Zellen können zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen (Goodnow 1996). Auch von Gendosis-effekten anderer Zelloberflächenrezeptoren, wie CD40 (Mehling et al. 2001) und CD19 (Sato et al. 2000), die für die Kontrolle von Immunzellinteraktionen entscheidend sind, wurde beschrieben, dass sie die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen fördern.
Die Ergebnisse, dass die psoriasiforme Dermatitis weder spontan im $CD18^{wt}$ Tier mit normaler CD18-Expression, noch in heterozygoten $CD18^{hypo/wt}$ Mäusen und auch nicht in $CD18^{null}$ Mutanten auftritt, sprechen dafür, dass 2 - 16% Restexpression der $CD18^{hypo}$ PL/J-Tiere offensichtlich einen die Krankheit präzipitierenden Grenzwert der CD18-Expression darstellt, der weder über- noch unterschritten werden darf.

4.3. Das $CD18^{hypo}$ PL/J-Mausmodell ermöglicht die Identifizierung von mit der psoriasiformen Dermatitis assoziierten Chromosomenabschnitten

Andere Tiermodelle mit der Psoriasis ähnelndem Hautphänotyp sind die Mausmutationen flaky skin (Sundberg et al. 1994) und chronische proliferative Dermatitis (HogenEsch et al. 1994), HLA-B27 transgene Ratten (Hammer et al. 1990), eine vom Transplantat ausgehende „Graft-versus-Host“ Erkrankung aufgrund von Unterschieden in den Minor-Histokompatibilitätsantigenen (Schön et al. 1997), epidermale Fehlregulation des NF-κB-vermittelten Signalweges (Pasparakis et al. 2002), transgene β_1-Integrin-Überexpression in der murinen suprabasalen Epidermis (Carroll et al. 1995) und Transplantation von betroffener Haut von Psoriasispatienten auf SCID-Mäuse (Boehncke et al. 1994). Jedes dieser Modelle zeigt sowohl im klinischen und histologischen Bild als auch in verschiedenen Aspekten seiner Pathogenese Ähnlichkeiten zur humanen Psoriasis. Zwei der Modelle ahmen sogar die autoreaktive Eigenschaft von T-Zellen bei der Psoriasis nach (Boehncke et al. 1994, Schön et al. 1997). Im Gegensatz zu diesen Modellen ist das hier beschriebene Krankheitsmodell von besonderem Interesse, da eine bedeutende Mutation, die zur verminderten CD18-Expression führt, bekannt ist und die Möglichkeit besteht, weitere wichtige modifizierende Gene zu identifizieren.

4.3.1. Die in CD18^{hypo} Mäusen auftretenden 129/SvEv-Allele beeinflussen das Ergebnis der Kopplungsanalyse nicht

Die N2-Generation einer Rückkreuzung zwischen CD18^{hypo} Mäusen des für die psoriasiforme Dermatitis suszeptiblen PL/J- und des resistenten C57BL/6J-Stammes wurde mittels einer Mikrosatellitenanalyse genotypisiert. Für 16 der 83 ausgewählten Marker (in Anhang 2 in Fettschrift hervorgehoben) traten neben den PL/J- auch 129/SvEv-Allele auf (siehe 3.7.2.). Dies belegt, dass der CD18^{hypo} PL/J-Stamm keinen Inzuchtstamm darstellt, der durch identische genetische Information und das Auftreten nur eines Allels pro Genort charakterisiert ist. Da die CD18^{hypo} Mutation lediglich vier Generationen auf den PL/J-Stamm rückgekreuzt wurde (siehe 1.6.2.1.), sind noch Chromosomenbereiche des 129/SvEv-Stammes, der die CD18^{hypo} Mutation ursprünglich trug, vorhanden. Theoretisch liegt der Anteil der PL/J-Allele nach vier Rückzuchtgenerationen bei 93,75 %, während er nach sieben Generationen 99,2 % beträgt. Dass die Penetranz der psoriasiformen Dermatitis bei CD18^{hypo} PL/J-Mäusen nach Entfernen der „störenden“ 129/SvEv-Allele von der vierten bis zur siebten Rückzuchtgeneration von 91 % auf 100 % ansteigt (Bullard et al. 1996) deutet darauf hin, dass bei dieser Erkrankung PL/J-Allele homozygot vorliegen müssen. Da die an die Mäuse der N2-Generation vererbten 129/SvEv-Allele in der Kopplungsanalyse als PL/J-Allele angesehen wurden, könnten sie durchaus das Ergebnis beeinflusst haben. Dies konnte aber durch einen Vergleich der Phänotypen zwischen Gruppen, die das 129/SvEv-Fragment trugen, und solchen, die lediglich das PL/J-Fragment aufwiesen, ausgeschlossen werden (siehe 3.7.5.). Für den Marker D4Mit256 traten auch für die CD18^{hypo} C57BL/6J-Mäuse zwei Fragmentlängen auf (siehe 3.7.2.). Dies zeigt, dass auch nach zehn Rückzuchtgenerationen noch Chromosomenbereiche des 129/SvEv-Stammes, der die CD18^{hypo} Mutation ursprünglich trug, vorhanden sind und es sich bei diesen Tieren ebenfalls nicht um einen reinen Inzuchtstamm handelt. Allerdings ist der 129/SvEv-Anteil deutlich geringer als in den nur vier Generationen rückgekreuzten CD18^{hypo} PL/J-Mäusen.

Mit den augewählten 83 Markern konnte das Genom so abgedeckt werden, dass der Abstand zwischen den Markern beziehungsweise zu den Chromosomenenden 30 cM nicht überstieg. Lediglich auf Chromosom 10 zwischen den Markern D10Mit86 (17 cM) und D10Mit233 (62 cM) gibt es eine Lücke von 45 cM. In dem Bereich zwischen 20 und 60 cM konnten keine polymorphen Marker gefunden werden. Einige der untersuchten Marker in diesem Bereich zeigten weder die Fragmentlänge des PL/J- noch die des C57BL/6J-Stammes. Daher scheint bei den CD18^{hypo} PL/J- und C57BL/6J-Mäusen an dieser Stelle ein Chromosomenabschnitt

eines anderen Mausstammes eingefügt zu sein. CD18 liegt bei 41,5 cM auf Chromosom 10, also in dem Bereich, in dem sich keine polymorphen Marker finden. Bei beiden Stämmen wurde die $CD18^{hypo}$ Mutation gleichermaßen unter Verwendung einer embryonalen Stammzell-Linie des Mausstammes 129/SvEv in das CD18-Gen eingebracht (siehe 1.6.2.1.). Trotz Rückkreuzungen auf den C57BL/6J- beziehungsweise den PL/J-Mausstamm in der zehnten beziehungsweise vierten Generation findet sich in einem Bereich um das CD18-Gen immer noch das 129/SvEv-Allel. Dieser Bereich scheint in beiden $CD18^{hypo}$ Mausstämmen etwa gleich groß zu sein.

Sind die Abstände zwischen zwei Markern zu groß, wie auf Chromosom 10 zwischen D10Mit86 und D10Mit233, treten sehr viele Rekombinationen auf und die Berechnung ihrer genetischen Position wird ungenau. Auch könnte eine solch große Lücke die Berechnung der LOD-Scores beeinflussen, da Informationen über diesen Zwischenbereich fehlen. Es ist anzunehmen, dass sich zwischen 20 und 60 cM ein eingefügter Chromosomenabschnitt befindet, der im suszeptiblen und resistenten Stamm gleich ist. Daher dürften für diesen Bereich in der Kopplungsanalyse keine Genorte mit hohen LOD-Scores ermittelt werden. Die in Abb. 23 dargestellten Kurvenverläufe, die hohe Werte in diesem Bereich zeigen, müssen daher kritisch gesehen werden. Die LOD-Scores für die Chromosomenabschnitte zu beiden Seiten des eingefügten Bereichs konnten aber durch Kontrollen bestätigt werden (siehe 3.7.5.). Neben dem Bereich um den Marker D10Mit86, der die höchsten LOD-Scores aufweist, gibt es auf Chromosom 10 noch einen zweiten Genort im Bereich der Marker D10Mit233 und D10Mit14, der möglicherweise mit der psoriasiformen Dermatitis gekoppelt ist.

4.3.2. Für die Auslösung der psoriasiformen Dermatitis sind ein bis zwei, für den Schweregrad dagegen vier oder mehr PL/J-Allele verantwortlich

Nach Verpaarung von Mäusen des resistenten C57BL/6J- und des suszeptiblen PL/J-Stammes trat bei den Mäusen der F1-Generation kein psoriasiformer Phänotyp auf (siehe 2.2.1.2.2.). Dies zeigte sich bereits in einem von Bullard durchgeführten Rückzuchtexperiment (Bullard et al. 1996) und deutet darauf hin, dass zumindest ein entscheidendes der für die Entstehung der Erkrankung verantwortlichen PL/J-Allele rezessiv gegenüber dem C57BL/6J-Allel ist. Um in der N2-Generation Homozygotie für PL/J-Allele zu erhalten, wurde auf den suszeptiblen PL/J-Stamm rückgekreuzt. 39 % der Nachkommen waren suszeptibel für die psoriasiforme Dermatitis (siehe 3.7.1.). In dem Rückzuchtexperiment von Bullard zeigten 50 % der N2-Mäuse Anzeichen der Hauterkrankung (Bullard et al. 1996). Die Abweichung könnte in

der nicht repräsentativen Anzahl von lediglich 62 untersuchten N2-Mäusen begründet liegen, während in der hier vorgestellten Rückkreuzung 343 Nachkommen der N2-Generation generiert wurden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Unterschiede auf der Verwendung unterschiedlich homogener $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäuse beruhen. In der Studie von Bullard wurden Mäuse verwendet, bei denen die $CD18^{hypo}$ Mutation sieben Generationen auf den PL/J-Stamm rückgezüchtet war. Während diese Tiere zu 100 % die psoriasiforme Dermatitis entwickeln, tritt sie lediglich bei 91 % der in der hier durchgeführten Rückkreuzung eingesetzten Mäuse der N4-Generation auf (Bullard et al. 1996). Eine geringere Häufigkeit des psoriasiformen Phänotyps in der Elterngeneration könnte auch eine reduzierte Penetranz in der N2-Generation zur Folge haben.

50 % Suszeptibilität in der N2-Generation einer Rückkreuzung lässt vermuten, dass die Auslösung der Erkrankung neben der $CD18^{hypo}$ Mutation lediglich durch ein weiteres Gen kontrolliert wird. Dies wird durch eine weitere Studie unterstützt, in der (PL/J x C57BL/6J) F1-Mäuse nicht auf einen der Elternstämme rückgekreuzt, sondern untereinander verpaart wurden (Barlow et al. 2003). 23,5 % der 494 Mäuse der F2-Generation waren suszeptibel für die psoriasiforme Dermatitis. Der prozentuale Anteil an betroffenen F2-Mäusen wich nicht signifikant von den 25 % ab, die für einen autosomal rezessiven monogenen Erbgang zu erwarten waren. Es zeigte sich aber, dass lediglich 6,1 % der F2-Mäuse einen schweren psoriasiformen Phänotyp entwickelten. In der hier durchgeführten Rückkreuzung war ein etwa doppelt so hoher Prozentsatz zu erwarten. Entsprechend zeigten 16 % der N2-Mäuse einen „Maxscore“ von 3 oder 4 (siehe 3.7.1.). Da analoge Beurteilungsysteme für den Phänotyp der $CD18^{hypo}$ Mäuse verwendet wurden, konnten die Ergebnisse aus beiden Studien verglichen werden.

Während in der Elterngeneration 100 % (N7-Generation) beziehungsweise 91 % (N4-Generation) der $CD18^{hypo}$ PL/J-Mäuse eine schwere psoriasiforme Dermatitis entwickeln, reduziert sich dieser Anteil in der F2- beziehungsweise N2-Generation auf weniger als 50 % der suszeptiblen Tiere. Überwiegend treten mildere Formen der Hauterkrankung auf („Maxscore“ 1 und 2). Daher scheinen nicht - wie bei der Suszeptibilität - ein bis maximal zwei, sondern vermutlich vier oder mehr Gene - zusätzlich zur Mutation im CD18-Gen - an der Ausprägung des Schweregrades der psoriasiformen Dermatitis beteiligt zu sein. Auch bei Mausmodellen für andere komplexe Autoimmunerkrankungen wurden Genorte identifiziert, die den Schweregrad, nicht aber die Suszeptibilität beeinflussen (Bergsteinsdottir et al. 2000, Becanovic et al. 2003).

Die Gene, die den Schweregrad bestimmen, könnten auch die Auslösung der Erkrankung beeinflussen. Bei Mäusen, die einen höheren „Maxscore“ erreichten, traten erste Symptome der psoriasiformen Dermatitis früher auf als bei weniger stark betroffenen Tieren. Für den Phänotyp „AUC34“ erreichten stärker betroffene Mäuse höhere Werte als weniger stark betroffene. Die Abhängigkeit von den Phänotypen „Maxscore“ und „Onset“ ergibt sich aus der Definition des „AUC34“ als Summe der adaptierten PASI-Scores, die nach dem Absetzen zweiwöchentlich über einen Zeitraum von 34 Wochen bestimmt wurden (siehe 2.2.1.3.1.). Zusätzlich fließt ein, wie lange die Erkrankung andauert und ob der Schweregrad mit der Zeit abnimmt. Dadurch kann der Verlauf der Erkrankung beurteilt werden. Beim Merkmal des Geschlechtes wurde zwischen Männchen und Weibchen unterschieden. Es stellte sich heraus, dass weibliche CD18^{hypo} Mäuse empfänglicher für die psoriasiforme Dermatitis waren als ihre männlichen Geschwister. 54 % der Weibchen, aber nur 22 % der Männchen entwickelten Anzeichen der Hauterkrankung. Das Geschlecht scheint die Suszeptibilität, aber auch die anderen Phänotypen, auf eine interaktive Weise zu beeinflussen, da unter dieser Annahme zahlreiche zusätzliche Genorte mögliche Kopplung zeigten (siehe 3.7.3.). Unter der Bedingung, dass das Geschlecht als additive Covariante von Bedeutung ist, traten dagegen keine Veränderungen gegenüber der Annahme auf, dass das Geschlecht keine Rolle spielt.

Bei der Kopplungsanalyse ergab sich, dass auf den Chromosomen 10 und 6 Gene liegen, die entscheidend für die Ausprägung der psoriasiformen Dermatitis sind. Der Genort auf Chromosom 6 scheint besonders den Zeitpunkt des Auftretens zu beeinflussen, da für den Phänotyp „Onset“ die höchsten LOD-Scores auftraten. Es gab auch Hinweise, dass auf den Chromosomen 1, 4 und 18 weitere Genorte vorhanden sind, die bei der Hauterkrankung der CD18^{hypo} PL/J-Mäuse eine Rolle spielen. Jeder der fünf untersuchten Genorte schien in homozygoter Form stärker zur Auslösung der psoriasiformen Dermatitis beizutragen als im heterozygoten Zustand (siehe 3.7.4.). Dadurch lässt sich für jeden dieser Genorte ausschließen, dass das PL/J-Allel dominant über das jeweilige C57BL/6J-Allel ist. Es lässt sich aber nicht sagen, ob sich die PL/J-Allele rezessiv oder codominant gegenüber den C57BL/6J-Allelen verhalten. In beiden Fällen ist die Erkrankung bei homozygoten Mäusen für das PL/J-Allel schwerer als bei Heterozygoten. Bei einer Rückkreuzung können aber keine Aussagen über Unterschiede zwischen Heterozygoten und Homozygoten für das C57BL/6J-Allel gemacht werden. Eine Kreuzung zwischen F1-Mäusen könnte darüber Aufschluss geben, weil in der F2-Generation auch Homozygotie für das C57BL/6J-Allel auftritt. Bei einer Kopplungsanalyse von F2-Mäusen ist zu erwarten, dass zum Teil andere Genorte als bei einer Rückkreuzung auftreten,

da der genetische Hintergrund bei komplexen Erkrankungen für die Wirkung einzelner Gene entscheidend ist.

4.3.3. Die mit der psoriasiformen Dermatitis der CD18^{hypo} PL/J-Mäuse assoziierten Genorte könnten auch bei der Psoriasis des Menschen und anderen entzündlichen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen

In der Kopplungsanalyse wird anhand der zwischen den Markern auftretenden Rekombinationen die genetische Position der einzelnen Marker berechnet. Je mehr Mäuse analysiert werden, desto genauer ist die Position. Auch eine größere Anzahl an Markern präzisiert ihre Lage auf den Chromosomen. Um die Ergebnisse verschiedener Kopplungsanalysen vergleichen zu können, ist die Umrechnung in die aus Datenbanken bekannten genetischen Positionen der Marker notwendig. In der hier durchgeführten Kopplungsanalyse ist diese Umrechnung durch die geringe Anzahl von 94 N2-Mäusen relativ ungenau. Nach Analyse der verbleibenden 249 Tiere der N2-Generation wird eine genauere Bestimmung der genetischen Positionen der Marker möglich sein. Exakter wird der Vergleich, wenn man statt der genetischen Position die physikalische Position betrachtet. Diese ist nach der Sequenzierung des Mausgenoms (Waterston et al. 2002) für die meisten Marker bekannt. Für die in dieser Kopplungsanalyse verwendeten Marker ist sie in Anhang 2 angegeben. Da auch das menschliche Genom sequenziert ist (Lander et al. 2001), ist für fast jeden Chromosomenabschnitt der Maus bekannt, wo sich der entsprechende Abschnitt im menschlichen Genom befindet.
Für die mit der psoriasiformen Erkrankung im CD18^{hypo} Mausmodell assoziierten Regionen auf den Chromosomen 1, 4 und 6 (siehe 3.7.3.) zeigten die entsprechenden Bereiche im menschlichen Genom auf dem langen (1q) und kurzen Arm (1p) von Chromosom 1 beziehungsweise auf Chromosom 3q bereits Kopplung mit der Psoriasis vulgaris. PSORS4 (Capon et al. 1999), PSORS7 (Veal et al. 2001) und PSORS5 (Enlund et al. 1999) liegen in den jeweiligen Chromosomenabschnitten. Da die in dieser Kopplungsanalyse gefundenen Genorte auf den Chromosomen 1, 4 und 6 mit Bereichen korreliert werden können, die in Studien mit Psoriasispatienten ermittelt wurden, ist es von besonderem Interesse, die in ihnen enthaltenen Gene zu finden, die mit der Hauterkrankung zusammenhängen. Die gegenüber den anderen Phänotypen deutlich höheren LOD-Scores für den Phänotyp „Onset“, deuten darauf hin, dass das auf Chromosom 6 lokalisierte Gen dabei besonders Einfluss auf den Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome nimmt. Die stärkste Kopplung zeigte aber ein Abschnitt auf Chromosom 10 zwischen 12 und 28 cM. Die entsprechende Region ist beim

Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 6 zwischen den Banden 6q16 und 6q25 lokalisiert. Bisher ist dieser Genort aber nicht bei Kopplungsanalysen von Psoriasispatienten aufgetreten. Gleiches gilt für die dem Anfang des Chromosoms 18 (0 - 34 cM) entsprechenden Bereiche, die auf unterschiedliche Chromosomen des Menschen verteilt sind. Sie befinden sich auf den Chromosomen 5q, 10p und 18q. Dennoch ist es auch für diese Genorte interessant, die an der Ausprägung der psoriasiformen Dermatitis beteiligten Gene zu identifizieren. Ein Gen auf Chromosom 10 scheint von zentraler Bedeutung für die Entwicklung der Hautkrankheit zu sein. Die Identifizierung der für die Erkrankung verantwortlichen Gene im Mausmodell kann zur Aufklärung der Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis beitragen und somit auch wertvolle Hinweise geben, wie es zur Auslösung der Psoriasis beim Menschen kommt. Auch das im $CD18^{hypo}$ PL/J-Mausmodell zentrale CD18-Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 21q in einem Bereich, für den bisher in Studien mit Psoriasis-Familien keine Kopplung gefunden wurde. Dafür befinden sich in PSORS2 auf 17q mit ICAM-2 (Tomfohrde et al. 1994) und in PSORS6 auf 19p mit ICAM-1 (Lee et al. 2000) zwei der bedeutendsten Liganden der β_2-Integrine. Es könnte sein, dass bei der Psoriasis des Menschen nicht unbedingt β_2-Integrine selbst, sondern für ihre Wirkungsweise entscheidende Faktoren verändert sind. Der Genort, für den bisher die stärkste Verbindung zur Psoriasis vulgaris gezeigt werden konnte, ist PSORS1 in Bande 6p21 (Nair et al. 1997, Trembath et al. 1997). PSORS1 enthält mit HLA-C unter anderem eines der MHC-Gene. Die entsprechende Region, die den bei der Maus als H-2 bezeichneten MHC enthält, liegt auf Chromosom 17. In der hier durchgeführten Studie konnte keine Kopplung für Chromosom 17 festgestellt werden, obwohl PL/J-Mäuse mit $H\text{-}2^{u}$ und C57BL/6J-Mäuse mit $H\text{-}2^{b}$ einen unterschiedlichen MHC besitzen und dieser bei zahlreichen entzündlichen Erkrankungen eine Rolle spielt (Hammer et al. 1990, Lindqvist et al. 2002). Dies entsprach den Ergebnissen aus einer früheren Rückkreuzung zwischen den $CD18^{hypo}$ PL/J- und C57BL/6J-Stämmen, in der ebenfalls keine Korrelation zwischen der H-2-Region und der psoriasiformen Dermatitis auftrat (Bullard et al. 1996). In dieser Studie wurde zugleich eine Kopplung mit den Bindungspartnern des CD18 ausgeschlossen. Das CD11-Gencluster liegt auf Chromosom 7 der Maus, für das auch in der hier durchgeführten Kopplungsanalyse keine erhöhten LOD-Scores auftraten.

Einige der Chromosomenabschnitte, die Kopplung mit der psoriasiformen Dermatitis zeigten, wurden bereits in Kopplungsanalysen von Mausmodellen anderer komplexer entzündlicher Erkrankungen identifiziert. Die Region am distalen Ende des Chromosoms 1 trat bei mehreren Erkrankungen auf (Karlsson et al. 2003). Man nimmt an, dass sie Gene enthält, die für verschiedene Prozesse wichtig sind, die zur Auslösung von Autoimmunerkrankungen führen

(Johansson et al. 2001). Aber auch für die in der hier durchgeführten Kopplungsanalyse gefundenen Bereiche auf den Chromosomen 6, 10 und 18 wurde bereits Kopplung mit anderen Erkrankungen festgestellt (Jirholt et al. 2002). Die in diesen Regionen lokalisierten Gene könnten an pathogenetischen Prozessen beteiligt sein, die nicht nur bei der psoriasiformen Dermatitis sondern allgemein bei entzündlichen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen. Die Identifizierung dieser Gene könnte somit auch zur Aufklärung der Pathogenese anderer komplexer Erkrankungen beitragen.

5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass $CD4^+$, nicht aber $CD8^+$ T-Zellen bei der Pathogenese der psoriasiformen Dermatitis im $CD18^{hypo}$ PL/J-Mausmodell eine entscheidende Rolle spielen. Die stark erhöhte Anzahl an Makrophagen in betroffener Haut von $CD18^{hypo}$ im Vergleich zu $CD18^{wt}$ Mäusen deutet darauf hin, dass sie im Zusammenspiel mit T-Zellen für die Entstehung der psoriasiformen Dermatitis mit verantwortlich sind. Um dies zu überprüfen, können die Makrophagen mittels des liposomal verkapselten Bisphosphonats Clodronat depletiert (Van Rooijen und Sanders 1994) und Veränderungen des Schweregrads der psoriasiformen Dermatitis quantifiziert werden. Die Identifizierung der von $CD18^{hypo}$ Makrophagen freigesetzten Zytokine könnte darüber Aufschluss geben, ob sie - wie in $CD18^{null}$ Mäusen - zu einem Überwiegen von $CD4^+$ Th1-Zellen beitragen oder auch Keratinozyten zur Proliferation stimulieren können.

Da die Psoriasis als Autoimmunerkrankung angesehen wird und β_2-Integrine während der intrathymischen T-Zellentwicklung eine Rolle zu spielen scheinen, könnte die reduzierte CD18-Expression die Bildung und das Fortbestehen von autoreaktiven T-Zellen beeinflussen. Der Einfluss von CD18 auf die T-Zellselektion könnte anhand der Experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell für die Multiple Sklerose, untersucht werden. Hierbei handelt es sich, wie bei der Psoriasis, um eine Th1-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, bei der das Autoantigen bekannt ist. Nach Verpaaren der suszeptiblen Mäuse mit den $CD18^{hypo}$ beziehungsweise $CD18^{null}$ Mauslinien kann die Rolle des Gendosiseffekts des CD18-Moleküls bei Bildung und Fortbestehen autoreaktiver T-Zellen untersucht werden.

Durch eine Kopplungsanalyse der N2-Generation einer Rückkreuzung zwischen dem suszeptiblen PL/J- und dem resistenten C57BL/6J-Stamm konnten in dieser Arbeit Chromosomenabschnitte mit Genen identifiziert werden, die zusätzlich zur $CD18^{hypo}$ Mutation für die Manifestation der psoriasiformen Dermatitis verantwortlich sind. Um die Kopplung dieser Genorte zu bestätigen und den Kandidatenbereich einzugrenzen, könnten die N2-Mäuse mit zusätzlichen Markern in den betreffenden Regionen genotypisiert werden. Auch die Kopplungsanalyse aller 343 Nachkommen der N2-Generation wird aufgrund der höheren Mauszahl und des Vorkommens auch niedrigerer „Maxscores“ aussagekräftiger sein und zur Bestätigung beziehungsweise dem Ausschluss von Genorten führen, die in der ersten Analyse mit 94 Tieren Kopplung zeigten. Da das Geschlecht eine Rolle zu spielen scheint, könnte eine

getrennte Kopplungsanalyse der Männchen und Weibchen - trotz der geringeren Anzahl der N2-Mäuse - zu höheren LOD-Scores oder sogar zur Identifizierung neuer Genorte führen (Vingsbo-Lundberg et al. 1998).

Der nächste Schritt, um Gene in den jeweiligen Kandidatenbereichen zu identifizieren, ist die Erzeugung kongener Stämme (Wakeland et al. 1997). Hierbei wird der Chromosomenbereich, der Kopplung zeigt, vom suszeptiblen PL/J-Stamm in einen resistenten C57BL/6J-Hintergrund gebracht. Da dieser Abschnitt nach Rückzucht den einzigen Unterschied zu dem $CD18^{hypo}$ C57BL/6J-Stamm darstellt, können Einflüsse auf den Phänotyp, wie beispielsweise das Auftreten einer psoriasiformen Dermatitis, auf diesen Genort zurückgeführt werden. Ausgehend von diesen kongenen Stämmen könnten die Kandidatenbereiche weiter eingeengt und einzelne Gene identifiziert werden.

Gene, die anhand des $CD18^{hypo}$ Mausmodells ermittelt werden, könnten auch bei der humanen Erkrankung eine Rolle spielen. Daher kann die genetische Analyse der $CD18^{hypo}$ Mäuse auf lange Sicht zur Aufklärung der Pathogenese der Psoriasis beitragen. Auch weiterführende Untersuchungen der Pathogenese im $CD18^{hypo}$ PL/J-Mausmodell und insbesondere die Aufklärung der Bedeutung einer CD18-Restexpression von 2 - 16 % für die Entstehung und Aufrechterhaltung des psoriasiformen Phänotyps sollten einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung von polygenen entzündlichen Dermatosen leisten und vermutlich auch für die Pathogenese, Prävention und Therapie von anderen entzündlichen Erkrankungen des Menschen bedeutsam sein.

6. Literaturverzeichnis

Abrams, J.R., M.G. Lebwohl, C.A. Guzzo, B.V. Jegasothy, M.T. Goldfarb, B.S. Goffe, A. Menter, N.J. Lowe, G. Krueger, M.J. Brown, R.S. Weiner, M.J. Birkhofer, G.L. Warner, K.K. Berry, P.S. Linsley, J.G. Krueger, H.D. Ochs, S.L. Kelley und S. Kang. 1999. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 103:1243-1252.

Ameen, M. 2003. Genetic basis of psoriasis vulgaris and its pharmacogenetic potential. *Pharmacogenomics* 4:297-308.

Anderson, D.C., T.K. Kishimoto und C.W. Smith. 1995. *In* Leukocyte adhesion deficiency and other disorders of leukocyte adherence and motility. C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly und D. Valle (Herausgeber). McGraw-Hill, New York. 3955-3994.

Anderson, D.C., L.J. Miller, F.C. Schmalstieg, R. Rothlein und T.A. Springer. 1986. Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit- specific monoclonal antibodies. *J Immunol* 137:15-27.

Anderson, D.C., F.C. Schmalsteig, M.J. Finegold, B.J. Hughes, R. Rothlein, L.J. Miller, S. Kohl, M.F. Tosi, R.L. Jacobs, T.C. Waldrop, A.S. Goldman, W.T. Shearer und T.A. Springer. 1985. The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 152:668-689.

Arnaout, M.A. 1990. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75:1037-1050.

Asadullah, K., W.D. Döcke, M. Ebeling, M. Friedrich, G. Belbe, H. Audring, H.D. Volk und W. Sterry. 1999. Interleukin 10 treatment of psoriasis: clinical results of a phase 2 trial. *Arch Dermatol* 135:187-192.

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

Bachelez, H., B. Flageul, L. Dubertret, S. Fraitag, R. Grossman, N. Brousse, D. Poisson, R.W. Knowles, M.C. Wacholtz, T.P. Haverty, L. Chatenoud und J.F. Bach. 1998. Treatment of recalcitrant plaque psoriasis with a humanized non- depleting antibody to CD4. *J Autoimmun* 11:53-62.

Bachmann, M.F., K. McKall-Faienza, R. Schmits, D. Bouchard, J. Beach, D.E. Speiser, T.W. Mak und P.S. Ohashi. 1997. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 7:549-557.

Bagel, J., W.T. Garland, D. Breneman, M. Holick, T.W. Littlejohn, D. Crosby, H. Faust, D. Fivenson und J. Nichols. 1998. Administration of DAB389IL-2 to patients with recalcitrant psoriasis: a double-blind, phase II multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* 38:938-944.

Barker, J.N. 2001. Genetic aspects of psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 26:321-325.

Barlow, S.C., R.G. Collins, N.J. Ball, C.T. Weaver, T.R. Schoeb und D.C. Bullard. 2003. Psoriasiform dermatitis susceptibility in Itgb2(tm1Bay) PL/J mice requires low-level CD18 expression and at least two additional loci for progression to severe disease. *Am J Pathol* 163:197-202.

Beatty, P.G., H.D. Ochs, J.M. Harlan, T.H. Price, H. Rosen, R.F. Taylor, J.A. Hansen und S.J. Klebanoff. 1984. Absence of monoclonal-antibody-defined protein complex in boy with abnormal leucocyte function. *Lancet* 1:535-537.

Becanovic, K., E. Wallstrom, B. Kornek, A. Glaser, K.W. Broman, I. Dahlman, P. Olofsson, R. Holmdahl, H. Luthman, H. Lassmann und T. Olsson. 2003. New loci regulating rat myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 170:1062-1069.

Bergsteinsdottir, K., H.T. Yang, U. Pettersson und R. Holmdahl. 2000. Evidence for common autoimmune disease genes controlling onset, severity, and chronicity based on experimental models for multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *J Immunol* 164:1564-1568.

Bhalerao, J. und A.M. Bowcock. 1998. The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. *Hum Mol Genet* 7:1537-1545.

Boehncke, W.H., W. Sterry, A. Hainzl, W. Scheffold und R. Kaufmann. 1994. Psoriasiform architecture of murine epidermis overlying human psoriatic dermis transplanted onto SCID mice. *Arch Dermatol Res* 286:325-330.

Boehncke, W.H., S. Wortmann, R. Kaufmann, V. Mielke und W. Sterry. 1995. A subset of macrophages located along the basement membrane ("lining cells") is a characteristic histopathological feature of psoriasis. *Am J Dermatopathol* 17:139-144.

Brandrup, F., N. Holm, N. Grunnet, K. Henningsen und H.E. Hansen. 1982. Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Derm Venereol* 62:229-236.

Braun-Falco, O., G. Plewig, H.H. Wolff und W.H.C. Burgdorf. 2000. Dermatology. Springer, Berlin, Heidelberg.

Braverman, I.M. und J. Sibley. 1982. Role of the microcirculation in the treatment and pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 78:12-17.

Breathnach, S.M. und W.G. Phillips. 1996. Psoriasis. *In* Cytokines in Autoimmunity. F.M. Brennan und M. Feldmann (Herausgeber). R.G. Landes Company, Austin, Texas. 175-200.

Broman, K.W., H. Wu, S. Sen und G.A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889-890.

Bullard, D.C., K. Scharffetter-Kochanek, M.J. McArthur, J.G. Chosay, M.E. McBride, C.A. Montgomery und A.L. Beaudet. 1996. A polygenic mouse model of psoriasiform skin disease in CD18-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2116-2121.

Capon, F., G. Novelli, S. Semprini, M. Clementi, M. Nudo, P. Vultaggio, C. Mazzanti, T. Gobello, A. Botta, G. Fabrizi und B. Dallapiccola. 1999. Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. *J Invest Dermatol* 112:32-35.

Carlos, T.M. und J.M. Harlan. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068-2101.

Carroll, J.M., M.R. Romero und F.M. Watt. 1995. Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell* 83:957-968.

Chaudhari, U., P. Romano, L.D. Mulcahy, L.T. Dooley, D.G. Baker und A.B. Gottlieb. 2001. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 357:1842-1847.

Davignon, D., E. Martz, T. Reynolds, K. Kurzinger und T.A. Springer. 1981. Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J Immunol* 127:590-595.

Delves, P.J. und I.M. Roitt. 2000a. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:37-49.

Delves, P.J. und I.M. Roitt. 2000b. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343:108-117.

Devereux, T.R. und N.L. Kaplan. 1998. Use of quantitative trait loci to map murine lung tumor susceptibility genes. *Exp Lung Res* 24:407-417.

Dimanche, M.T., F. Le Deist, A. Fischer, M.A. Arnaout, C. Griscelli und B. Lisowska-Grospierre. 1987. LFA-1 beta-chain synthesis and degradation in patients with leukocyte-adhesive proteins deficiency. *Eur J Immunol* 17:417-419.

Duffy, D.L., L.S. Spelman und N.G. Martin. 1993. Psoriasis in Australian twins. *J Am Acad Dermatol* 29:428-434.

Elder, J.T., R.P. Nair, T. Henseler, S. Jenisch, P. Stuart, N. Chia, E. Christophers und J.J. Voorhees. 2001. The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol* 137:1447-1454.

Ellis, C.N. und G.G. Krueger. 2001. Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl J Med* 345:248-255.

Enlund, F., L. Samuelsson, C. Enerbäck, A. Inerot, J. Wahlström, M. Yhr, A. Torinsson, J. Riley, G. Swanbeck und T. Martinsson. 1999. Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *Eur J Hum Genet* 7:783-790.

Feinberg, A.P. und B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.

Feldman, S.R., S.M. Ravis, A.B. Fleischer, Jr., A. McMichael, E. Jones, R. Kaplan, J. Shavin, J. Weiss, J.K. Bartruff, D.L. Levin, J. Del Rosso und N. Kpea. 2001. Betamethasone valerate in foam vehicle is effective with both daily and twice a day dosing: a single-blind, open-label study in the treatment of scalp psoriasis. *J Cutan Med Surg* 5:386-389.

Ferrero, I., F. Anjuere, P. Martin, G. Martinez del Hoyo, M.L. Fraga, N. Wright, R. Varona, G. Marquez und C. Ardavin. 1999. Functional and phenotypic analysis of thymic B cells: role in the induction of T cell negative selection. *Eur J Immunol* 29:1598-1609.

Fine, J.S. und A.M. Kruisbeek. 1991. The role of LFA-1/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. *J Immunol* 147:2852-2859.

Fischer, A., P.H. Trung, B. Descamps-Latscha, B. Lisowska-Grospierre, I. Gerota, N. Perez, C. Scheinmetzler, A. Durandy, J.L. Virelizier und C. Griscelli. 1983. Bone-marrow transplantation for inborn error of phagocytic cells associated with defective adherence, chemotaxis, and oxidative response during opsonised particle phagocytosis. *Lancet* 2:473-476.

Fredriksson, T. und U. Pettersson. 1978. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 157:238-244.

Gell, P.G. und R.R. Coombs. 1963. Clinical Aspects of Immunology. Blackwell, Oxford.

Gencik, M., S. Meller, S. Borgmann, T. Sitter, A.M. Menezes Saecker, H. Fricke und J.T. Epplen. 2000. The association of CD18 alleles with anti-myeloperoxidase subtypes of ANCA-associated systemic vasculitides. *Clin Immunol* 94:9-12.

Ghoreschi, K., P. Thomas, S. Breit, T. Biedermann, J. Prinz, C. Sander, G. Plewig und M. Röcken. 2001. Interleukin 4-induced immune deviation as therapy for psoriasis. *J Invest Dermatol* 117:465. Abstract 453.

Ghoreschi, K., P. Thomas, S. Breit, M. Dugas, R. Mailhammer, W. Van Eden, R. Van Der Zee, T. Biedermann, J. Prinz, M. Mack, U. Mrowietz, E. Christophers, D. Schlöndorff, G. Plewig, C.A. Sander und M. Röcken. 2003. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med* 9:40-46.

Goodnow, C.C. 1996. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2264-2271.

Gottlieb, A., J.G. Krueger, R. Bright, M. Ling, M. Lebwohl, S. Kang, S. Feldman, M. Spellman, K. Wittkowski, H.D. Ochs, P. Jardieu, R. Bauer, M. White, R. Dedrick und M. Garovoy. 2000a. Effects of administration of a single dose of a humanized monoclonal antibody to CD11a on the immunobiology and clinical activity of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 42:428-435.

Gottlieb, A.B., M. Lebwohl, S. Shirin, A. Sherr, P. Gilleaudeau, G. Singer, G. Solodkina, R. Grossman, E. Gisoldi, S. Phillips, H.M. Neisler und J.G. Krueger. 2000b. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: results of a pilot, multicenter, multiple-dose, placebo- controlled study. *J Am Acad Dermatol* 43:595-604.

Gottlieb, S.L., P. Gilleaudeau, R. Johnson, L. Estes, T.G. Woodworth, A.B. Gottlieb und J.G. Krueger. 1995. Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med* 1:442-447.

Grabbe, S. und T. Schwarz. 1998. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today* 19:37-44.

Grabbe, S., G. Varga, S. Beissert, M. Steinert, G. Pendl, S. Seeliger, W. Bloch, T. Peters, T. Schwarz, C. Sunderkötter und K. Scharffetter-Kochanek. 2002. Beta2 integrins are required for skin homing of primed T cells but not for priming naive T cells. *J Clin Invest* 109:183-192.

Hammer, R.E., S.D. Maika, J.A. Richardson, J.P. Tang und J.D. Taurog. 1990. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63:1099-1112.

Hellgren, L. 1967. Psoriasis: The prevalence in sex, age and occupational groups, in total populations in Sweden: Morphology, inheritance and association with other skin and rheumatic diseases. Almqvist & Wiksell, Stockholm.

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

HogenEsch, H., M.J.J. Gijbels und C. Zurcher. 1994. The chronic proliferative dermatitis (cpd) mutation chromosome? *In* Handbook of Mouse Mutations with Skin, Hair Abnormatlities. Animal Models, Biomedical Tools. J.P. Sundberg (Herausgeber). CRC Press, Boca Raton. 217-220.

Hoit, B.D. und J.H. Nadeau. 2001. Phenotype-driven genetic approaches in mice: high-throughput phenotyping for discovering new models of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 11:82-89.

Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554.

Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.

Hynes, R.O. 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol* 9:M33-37.

Ishida-Yamamoto, A., H. Takahashi und H. Iizuka. 2000. Immunoelectron microscopy links molecules and morphology in the studies of keratinization. *Eur J Dermatol* 10:429-435.

Jacob, H.J., K. Lindpaintner, S.E. Lincoln, K. Kusumi, R.K. Bunker, Y.P. Mao, D. Ganten, V.J. Dzau und E.S. Lander. 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67:213-224.

Jirholt, J., A.K. Lindqvist, J. Karlsson, A. Andersson und R. Holmdahl. 2002. Identification of susceptibility genes for experimental autoimmune encephalomyelitis that overcome the effect of protective alleles at the eae2 locus. *Int Immunol* 14:79-85.

Johansson, A.C., M. Sundler, P. Kjellen, M. Johannesson, A. Cook, A.K. Lindqvist, B. Nakken, A.I. Bolstad, R. Jonsson, M. Alarcon-Riquelme und R. Holmdahl. 2001. Genetic control of collagen-induced arthritis in a cross with NOD and C57BL/10 mice is dependent on gene regions encoding complement factor 5 and FcgammaRIIb and is not associated with loci controlling diabetes. *Eur J Immunol* 31:1847-1856.

Jung, E.G. 1995. Dermatologie. Hippokrates, Stuttgart.

Karlsson, J., X. Zhao, I. Lonskaya, M. Neptin, R. Holmdahl und A. Andersson. 2003. Novel quantitative trait loci controlling development of experimental autoimmune encephalomyelitis and proportion of lymphocyte subpopulations. *J Immunol* 170:1019-1026.

Kishimoto, T.K., N. Hollander, T.M. Roberts, D.C. Anderson und T.A. Springer. 1987. Heterogeneous mutations in the beta subunit common to the LFA-1, Mac-1, and p150,95 glycoproteins cause leukocyte adhesion deficiency. *Cell* 50:193-202.

Koopman, G., M. de Graaff, A.C. Huysmans, C.J. Meijer und S.T. Pals. 1992. Induction of homotypic T cell adhesion by triggering of leukocyte function-associated antigen-1 alpha (CD11a): differential effects on resting and activated T cells. *Eur J Immunol* 22:1851-1856.

Krueger, J.G. 2002. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* 46:1-23; quiz 23-26.

Krueger, J.G., I.B. Walters, M. Miyazawa, P. Gilleaudeau, J. Hakimi, S. Light, A. Sherr und A.B. Gottlieb. 2000. Successful in vivo blockade of CD25 (high-affinity interleukin 2 receptor) on T cells by administration of humanized anti-Tac antibody to patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 43:448-458.

Kuijpers, T.W., R.A. Van Lier, D. Hamann, M. de Boer, L.Y. Thung, R.S. Weening, A.J. Verhoeven und D. Roos. 1997. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest* 100:1725-1733.

Lan, H., C.M. Kendziorski, J.D. Haag, L.A. Shepel, M.A. Newton und M.N. Gould. 2001. Genetic loci controlling breast cancer susceptibility in the Wistar-Kyoto rat. *Genetics* 157:331-339.

Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.

Lebwohl, M. und S. Ali. 2001. Treatment of psoriasis. Part 1. Topical therapy and phototherapy. *J Am Acad Dermatol* 45:487-498; quiz 499-502.

Lee, Y.A., F. Rüschendorf, C. Windemuth, M. Schmitt-Egenolf, A. Stadelmann, G. Nürnberg, M. Ständer, T.F. Wienker, A. Reis und H. Traupe. 2000. Genomewide scan in german families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *Am J Hum Genet* 67:1020-1024.

Lin, W.J., D.A. Norris, M. Achziger, B.L. Kotzin und B. Tomkinson. 2001. Oligoclonal expansion of intraepidermal T cells in psoriasis skin lesions. *J Invest Dermatol* 117:1546-1553.

Lindqvist, A.K., R. Bockermann, A.C.M. Johansson, K.S. Nandakumar, M. Johannesson und R. Holmdahl. 2002. Mouse models for rheumatoid arthritis. *Trends Genet* 18:S7-S13.

Lisowska-Grospierre, B., M.C. Bohler, A. Fischer, C. Mawas, T.A. Springer und C. Giscelli. 1986. Defective membrane expression of the LFA-1 complex may be secondary to the absence of the beta chain in a child with recurrent bacterial infection. *Eur J Immunol* 16:205-208.

Lomholt, G. 1963. Psoriasis: Prevalence, Spontaneous Course and Genetics. GEC GAD, Kopenhagen.

Manly, K.F., R.H. Cudmore, Jr. und J.M. Meer. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm Genome* 12:930-932.

Matthews, D., L. Fry, A. Powles, J. Weber, M. McCarthy, E. Fisher, K. Davies und R. Williamson. 1996. Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. *Nat Genet* 14:231-233.

Mease, P.J., B.S. Goffe, J. Metz, A. VanderStoep, B. Finck und D.J. Burge. 2000. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 356:385-390.

Mehling, A., K. Loser, G. Varga, D. Metze, T.A. Luger, T. Schwarz, S. Grabbe und S. Beissert. 2001. Overexpression of CD40 ligand in murine epidermis results in chronic skin inflammation and systemic autoimmunity. *J Exp Med* 194:615-628.

Meller, S., P. Jagiello, S. Borgmann, H. Fricke, J.T. Epplen und M. Gencik. 2001. Novel SNPs in the CD18 gene validate the association with MPO-ANCA+ vasculitis. *Genes Immun* 2:269-272.

Mentzer, S.J., S.H. Gromkowski, A.M. Krensky, S.J. Burakoff und E. Martz. 1985. LFA-1 membrane molecule in the regulation of homotypic adhesions of human B lymphocytes. *J Immunol* 135:9-11.

Miltenyi, S., W. Müller, W. Weichel und A. Radbruch. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238.

Monti, J., H. Zimdahl, H. Schulz, R. Plehm, D. Ganten und N. Hübner. 2003. The role of Wnk4 in polygenic hypertension: a candidate gene analysis on rat chromosome 10. *Hypertension* 41:938-942.

Morel, P., J.P. Revillard, J.F. Nicolas, J. Wijdenes, H. Rizova und J. Thivolet. 1992. Anti-CD4 monoclonal antibody therapy in severe psoriasis. *J Autoimmun* 5:465-477.

Mrowietz, U., K. Zhu und E. Christophers. 2000. Treatment of severe psoriasis with anti-CD25 monoclonal antibodies. *Arch Dermatol* 136:675-676.

Nair, R.P., T. Henseler, S. Jenisch, P. Stuart, C.K. Bichakjian, W. Lenk, E. Westphal, S.W. Guo, E. Christophers, J.J. Voorhees und J.T. Elder. 1997. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet* 6:1349-1356.

Neumüller, J., A. Dunky, H. Burtscher, R. Jilch und J.E. Menzel. 2001. Interaction of monocytes from patients with psoriatic arthritis with cultured microvascular endothelial cells. *Clin Immunol* 98:143-152.

Nickoloff, B.J. 1999. The immunologic and genetic basis of psoriasis. *Arch Dermatol* 135:1104-1110.

Nickoloff, B.J., J.M. Schröder, P. von den Driesch, S.P. Raychaudhuri, E.M. Farber, W.H. Boehncke, V.B. Morhenn, E.W. Rosenberg, M.P. Schön und M.F. Holick. 2000. Is psoriasis a T-cell disease? *Exp Dermatol* 9:359-375.

Nickoloff, B.J. und T. Wrone-Smith. 1999. Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol* 155:145-158.

Olofsson, P., J. Holmberg, J. Tordsson, S. Lu, B. Akerström und R. Holmdahl. 2003. Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nat Genet* 33:25-32.

Owen, C.M. und P.V. Harrison. 2000. Successful treatment of severe psoriasis with basiliximab, an interleukin-2 receptor monoclonal antibody. *Clin Exp Dermatol* 25:195-197.

Papp, K., R. Bissonnette, J.G. Krueger, W. Carey, D. Gratton, W.P. Gulliver, H. Lui, C.W. Lynde, A. Magee, D. Minier, J.P. Ouellet, P. Patel, J. Shapiro, N.H. Shear, S. Kramer, P. Walicke, R. Bauer, R.L. Dedrick, S.S. Kim, M. White und M.R. Garovoy. 2001.

The treatment of moderate to severe psoriasis with a new anti-CD11a monoclonal antibody. *J Am Acad Dermatol* 45:665-674.

Pasparakis, M., G. Courtois, M. Hafner, M. Schmidt-Supprian, A. Nenci, A. Toksoy, M. Krampert, M. Goebeler, R. Gillitzer, A. Israel, T. Krieg, K. Rajewsky und I. Haase. 2002. TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 417:861-866.

Peters, B.P., F.G. Weissman und M.A. Gill. 2000. Pathophysiology and treatment of psoriasis. *Am J Health Syst Pharm* 57:645-659.

Peters, T., W. Bloch, O. Pabst, C. Wickenhauser, C. Uthoff-Hachenberg, S.V. Schmidt, S. Grabbe, D. Keß, R. Hinrichs, K. Addicks, T. Krieg, R. Förster, W. Müller und K. Scharffetter-Kochanek. Haptenated Antigens Are Critical for the Elicitation of an Adaptive Immune Response in a Murine Model of Leukocyte-Adhesion Deficiency 1 (LAD1). *Zur Veröffentlichung eingereicht.*

Prinz, J. 1997. Psoriasis vulgaris - der lange Weg zur Autoimmunerkrankung. *In* Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie. G. Plewig und B. Przybilla (Herausgeber). Springer, Berlin, Heidelberg. 21-28.

Prinz, J.C. 2001. Psoriasis vulgaris--a sterile antibacterial skin reaction mediated by cross-reactive T cells? An immunological view of the pathophysiology of psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 26:326-332.

Quddus, J., A. Kaplan und B.C. Richardson. 1994. Anti-CD11a prevents deletion of self-reactive T cells in neonatal C57BR mice. *Immunology* 82:301-305.

Rao, K.S., K.K. Babu und P.D. Gupta. 1996. Keratins and skin disorders. *Cell Biol Int* 20:261-274.

Robert, C. und T.S. Kupper. 1999. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* 341:1817-1828.

Ross, G.D., R.A. Thompson, M.J. Walport, T.A. Springer, J.V. Watson, R.H. Ward, J. Lida, S.L. Newman, R.A. Harrison und P.J. Lachmann. 1985. Characterization of patients with an increased susceptibility to bacterial infections and a genetic deficiency of leukocyte membrane complement receptor type 3 and the related membrane antigen LFA-1. *Blood* 66:882-890.

Rothlein, R. und T.A. Springer. 1986. The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J Exp Med* 163:1132-1149.

Sato, S., M. Hasegawa, M. Fujimoto, T.F. Tedder und K. Takehara. 2000. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol* 165:6635-6643.

Schafer, J.L. 1999. Multiple imputation: a primer. *Stat Methods Med Res* 8:3-15.

Scharffetter-Kochanek, K., H. Lu, K. Norman, N. van Nood, F. Munoz, S. Grabbe, M. McArthur, I. Lorenzo, S. Kaplan, K. Ley, C.W. Smith, C.A. Montgomery, S. Rich und A.L. Beaudet. 1998. Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* 188:119-131.

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

Schön, M.P., M. Detmar und C.M. Parker. 1997. Murine psoriasis-like disorder induced by naive CD4+ T cells. *Nat Med* 3:183-188.

Schönlau, F., K. Scharffetter-Kochanek, S. Grabbe, B. Pietz, C. Sorg und C. Sunderkötter. 2000. In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. *Eur J Immunol* 30:2729-2740.

Shepel, L.A., H. Lan, J.D. Haag, G.M. Brasic, M.E. Gheen, J.S. Simon, P. Hoff, M.A. Newton und M.N. Gould. 1998. Genetic identification of multiple loci that control breast cancer susceptibility in the rat. *Genetics* 149:289-299.

Shier, P., G. Otulakowski, K. Ngo, J. Panakos, E. Chourmouzis, L. Christjansen, C.Y. Lau und W.P. Fung-Leung. 1996. Impaired immune responses toward alloantigens and tumor cells but normal thymic selection in mice deficient in the beta2 integrin leukocyte function-associated antigen-1. *J Immunol* 157:5375-5386.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517.

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

Springer, T.A., W.S. Thompson, L.J. Miller, F.C. Schmalstieg und D.C. Anderson. 1984. Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family and its molecular basis. *J Exp Med* 160:1901-1918.

Sundberg, J.P., D. Boggess, L.D. Shultz und W.G. Beamer. 1994. The Flaky Skin (fsn) mutation chromosome? *In* Handbook of Mouse Mutations with Skin, Hair Abnormatlities. Animal Models, Biomedical Tools. J.P. Sundberg (Herausgeber). CRC Press, Boca Raton. 253-268.

Thivolet, J. und J.F. Nicolas. 1994. Immunointervention in psoriasis with anti-CD4 antibodies. *Int J Dermatol* 33:327-332.

Tomfohrde, J., A. Silverman, R. Barnes, M.A. Fernandez-Vina, M. Young, D. Lory, L. Morris, K.D. Wuepper, P. Stastny, A. Menter und A. Bowcock. 1994. Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* 264:1141-1145.

Trembath, R.C., R.L. Clough, J.L. Rosbotham, A.B. Jones, R.D. Camp, A. Frodsham, J. Browne, R. Barber, J. Terwilliger, G.M. Lathrop und J.N. Barker. 1997. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 6:813-820.

Trepicchio, W.L., M. Ozawa, I.B. Walters, T. Kikuchi, P. Gilleaudeau, J.L. Bliss, U. Schwertschlag, A.J. Dorner und J.G. Krueger. 1999. Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I cytokine proinflammatory pathways in psoriasis lesions. *J Clin Invest* 104:1527-1537.

Unutmaz, D., P. Pileri und S. Abrignani. 1994. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med* 180:1159-1164.

Valdimarsson, H., B.S. Baker, I. Jonsdottir, A. Powles und L. Fry. 1995. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* 16:145-149.

Van de Kerkhof, P.C. und M.E. Franssen. 2001. Psoriasis of the scalp. Diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2:159-165.

Van de Kerkhof, P.C. und C.M. Weemaes. 1990. Skin manifestations in congenital deficiency of leucocyte-adherence glycoproteins (CDLG). *Br J Dermatol* 123:395-401.

Van den Oord, J.J. und C. de Wolf-Peeters. 1994. Epithelium-lining macrophages in psoriasis. *Br J Dermatol* 130:589-594.

Van der Flier, A. und A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305:285-298.

Van der Vieren, M., H. Le Trong, C.L. Wood, P.F. Moore, T. St John, D.E. Staunton und W.M. Gallatin. 1995. A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* 3:683-690.

Van Pelt, J.P.A., E.M.G.J. De Jong, P.E.J. van Erp und P.C.M. van de Kerkhof. 1997. Decreased CD11b expression on circulating polymorphonuclear leukocytes in patients with extensive plaque psoriasis. *Eur J Dermatol* 7:324-328.

Van Rooijen, N. und A. Sanders. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174:83-93.

Veal, C.D., R.L. Clough, R.C. Barber, S. Mason, D. Tillman, B. Ferry, A.B. Jones, M. Ameen, N. Balendran, S.H. Powis, A.D. Burden, J.N. Barker und R.C. Trembath. 2001. Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. *J Med Genet* 38:7-13.

Vingsbo-Lundberg, C., N. Nordquist, P. Olofsson, M. Sundvall, T. Saxne, U. Pettersson und R. Holmdahl. 1998. Genetic control of arthritis onset, severity and chronicity in a model for rheumatoid arthritis in rats. *Nat Genet* 20:401-404.

Von Andrian, U.H. und C.R. Mackay. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343:1020-1034.

Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.

Wakeland, E., L. Morel, K. Achey, M. Yui und J. Longmate. 1997. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). *Immunol Today* 18:472-477.

Waterston, R.H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562.

Wilson, R.W., C.M. Ballantyne, C.W. Smith, C. Montgomery, A. Bradley, W.E. O'Brien und A.L. Beaudet. 1993. Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. *J Immunol* 151:1571-1578.

Zhang, X.J., P.P. He, Z.X. Wang, J. Zhang, Y.B. Li, H.Y. Wang, S.C. Wei, S.Y. Chen, S.J. Xu, L. Jin, S. Yang und W. Huang. 2002. Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21(PSORS1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese hans. *J Invest Dermatol* 119:1361-1366.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACD	Allergische Kontakt-Dermatitis
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
APC	Antigen-präsentierende Zellen
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserum-Albumin
CBA	„Cytometric Bead Array“
CD	„Cluster of Differentiation“
$CD18^{hypo}$	Hypomorphe CD18-Mutation
$CD18^{null}$	CD18-Nullmutation
$CD18^{wt}$	Ohne Mutation im CD18-Gen (Wildtyp)
cM	Zentimorgan
CO_2	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“
FCS	Fetales Kälberserum
h	Stunde(n)
H-2	Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus
HE	Hämatoxylin/Eosin
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen („Human Leukocyte Antigen“)
H_2O	Wasser
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobase(n)
LAD1	Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Syndrom I
LFA-1	„Leukocyte Function-Associated Antigen-1“

LOD	„Logarithm of the Odds”
mAk	Monoklonale(r) Antikörper
Mb	Megabasen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“)
min	Minute(n)
p.a.	„pro analysi“
PASI	„Psoriasis Activity and Severity Index“
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes („Peripheral Blood Mononuclear Cells“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM-1	„Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1“
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSORS	„Psoriasis Susceptibility“
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCID	„Severe Combined Immunodeficiency“
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
Th	T-Helfer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ü.N.	Über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8. Anhang

Anhang 1

Übersicht über die während der Rückkreuzung vorgenommenen Verpaarungen und die Herkunft der Mäuse der N2-Generation. In der Elterngeneration (**P**) wurden Männchen (♂) des PL/J-Stammes mit Weibchen (♀) des C57BL/6J-Stammes verpaart. ♀ der **F1**-Generation wurden anschließend mit ♂ des PL/J-Stammes zusammengesetzt. Die Verpaarungen sind jeweils links und die daraus hervorgehenden Nachkommen rechts dargestellt. Individuelle Mäuse sind mit der Käfignummer (vor dem Bindestrich, z.B. 114/99 oder A17/99) und ihrer Ohrmarkierung (nach dem Bindestrich) gekennzeichnet.

P: Männchen (CD18^{hypo} PL/J) 114/99-3, 167/99-1 x Weibchen (CD18^{hypo} C57BL/6J) 111/99-10, 112/99-30, 114/99-1, -30

P (♂ x ♀)	**F1** (Weibchen)
114/99-3 x 114/99-1	154/99-33, 198/99-11
x 114/99-30	150/99-7, -10, -11
167/99-1 x 111/99-10	14/00-1, -3
x 112/99-30	4/00-1, -3, -7, -10, -11

P x F1 (♂ x ♀)	**N2** **Männchen**	**Weibchen**
114/99-3 x 150/99-7	6/00-11 bis -30	7/00-11 bis -31
x 150/99-11	6/00-1 bis -10	7/00-1 bis -10
	74/00-1 bis -10	73/00-1 bis -30
167/99-1 x 150/99-10	44/00-17, -30	43/00-30
	46/00-1, -3	45/00-1 bis -7
x 154/99-33	32/00-1 bis -11	33/00-1 bis -10
	46/00-7 bis -11	54/00-1 bis -17
x 198/99-11	44/00-3 bis -13	43/00-1 bis -17
x 4/00-1	84/00-3 bis -11	105/00-3 bis -30
	109/00-1 bis -13	
x 4/00-3	64/00-1 bis -17	65/00-1 bis -7
x 4/00-7	66/00-7	65/00-30
	120/00-1, -3	67/00-1 bis -7
		121/00-1 bis -10
x 4/00-10	64/00-30	65/00-10 bis -17
	66/00-1, -3	93/00-1, -3
	94/00-1, -10	
	95/00-3	
x 4/00-11	82/00-11 bis -30	67/00-10, -11
	84/00-1	78/00-17
		83/00-17
x 14/00-1	82/00-1 bis -10	83/00-1 bis -13
	106/00-1 bis -30	93/00-10 bis -13
		105/00-1
x 14/00-3	74/00-11 bis -17	78/00-1 bis -13
	120/00-10, -11	

P: Männchen (CD18^{hypo} PL/J) A17/99-♂, A18/99-♂, A19/99-♂, A22/00-♂ x Weibchen (CD18^{hypo} C57BL/6J) 112/99-1, 113/99-3, -10, 114/99-1, 115/99-3, -10

P (♂ x ♀)	**F1** (Weibchen)
A17/99-♂ x 114/99-1	A2/00-13, -17, A10/00-3, -7
x 115/99-10	A2/00-10, -11, A8/00-1
A18/99-♂ x 112/99-1	A8/00-7, -10, -11
x 115/99-3	A2/00-3, -7, A10/00-1
A19/99-♂ x 113/99-3	A10/00-11

P x F1 (♂ x ♀)	**N2** **Männchen**	**Weibchen**
A18/99-♂ x A2/00-3	A20/00-1	A79/00-1 bis -31
	A78/00-1	
x A2/00-7	A66/00-11, -30	A85/00-1 bis -30
	A84/00-1 bis -31	
x A8/00-7	A32/00-1	A31/00-1, -3
	A75/00-10	A73/00-1 bis -11
	A87/00-1 bis -30	A89/00-1 bis -10
x A8/00-10	A52/00-30, -31	A53/00-3 bis -30
	A75/00-13, -30	A57/00-1, -3
	A92/00-1 bis -30	A67/00-31
		A73/00-30
		A91/00-1, -3
x A8/00-11	A40/00-1 bis -7	A31/00-13 bis -30
	A64/00-3	A41/00-1 bis -10
	A94/00-1 bis -13	A58/00-13, -30
		A95/00-1 bis -30
x A10/00-1	A42/00-1 bis -10	A43/00-1, -3
	A74/00-1 bis -30	A71/00-13 bis -31
	A88/00-1 bis -31	A89/00-11, -33
A19/99-♂ x A10/00-11	A32/00-3 bis -11	A31/00-7 bis -11
A22/00-♂ x A2/00-10	A50/00-13, -30	A51/00-7 bis -13
	A72/00-1 bis -31	A71/00-1 bis -11
x A2/00-11	A52/00-1 bis -13	A51/00-30, -31
	A75/00-1	A71/00-33
x A2/00-13	A56/00-11 bis -30	A58/00-1 bis -11
x A2/00-17	A56/00-1 bis -10	A57/00-7 bis -31
	A78/00-3, -10	A80/00-1 bis -13
x A8/00-1	A40/00-10 bis -17	A41/00-11 bis -30
	A64/00-10	A65/00-1 bis -33
x A10/00-3	A42/00-13 bis -30	A43/00-7 bis -11
	A64/00-11 bis -33	A67/00-1 bis -31
	A66/00-1	
x A10/00-7	A50/00-1	A43/00-13, -30
		A51/00-1, -3

Anhang 2

Liste der für die erste Kopplungsanalyse von 94 Mäusen verwendeten Mikrosatellitenmarker, geordnet nach Chromosomen und der Lage der Marker auf ihnen. Die Einteilung wurde zunächst nach der physikalischen Position (in Mb) getroffen. Wenn diese nicht bekannt war (mit einem Fragezeichen markiert), wurde die genetische Position (in cM) herangezogen. Die jeweiligen Chromosomenenden wurden mit „qter" bezeichnet. Die Forward-Primer waren jeweils mit einem der Fluorochrome TET, FAM, HEX oder NED gekoppelt. Alle Marker weisen Unterschiede in der Fragmentlänge zwischen den CD18^{hypo} PL/J- und C57BL/6J-Mäusen auf. Die jeweiligen Fragmentlängen sind angegeben, wobei für den PL/J-Stamm bei einigen Markern auch Fragmentlängen für den Mausstamm 129/SvEv auftreten (in Fettschrift hervorgehoben).

Chro-mosom	Genetische Position [cM]	Physikalische Position [Mb]	Marker	Fluorochrom	Fragmentlänge für C57BL/6J	Fragmentlänge für PL/J
1	10	14,4	D1Mit430	NED	111	119
1	?	16,3	D10Mit44	HEX	148	160
1	25,7	45,8	D1Mit236	TET	152	136
1	39,1	75,1	D1Mcg101	TET	162	176
1	54	89	D1Mit440	FAM	114	**109**/124
1	66,8	129,3	D1Mit1001	NED	134	125
1	92,3	169,7	D1Mit111	NED	169	186
1	107,3	192	D1Mit292	FAM	201	197
1	127		1qter			
2	1	3,8	D2Mit1	TET	126	122
2	29	58,2	D2Mit242	NED	135	139
2	47,5	108,1	D2Mit100	NED	109	113
2	66,9	121,1	D2Mit395	HEX	126	133
2	86	154,6	D2Mit285	NED	139	150
2	105	178	D2Mit148	HEX	112	126
2	114		2qter			
3	28	53,3	D3Mit67	FAM	146	148
3	55	116,3	D3Mit57	HEX	157	155
3	66,2	137	D3Mit256	FAM	128	145
3	83,5	153	D3Mit352	NED	119	136
3	95		3qter			
4	17,9	20,3	D4Mit268	HEX	146	148/**244**
4	7,5	32	D4Mit193	FAM	139	122
4	44,5	93	D4Mit9	HEX	201	220
4	66,6	136,7	D4Mit170	NED	103	114
4	82,7	151,6	D4Mit256	HEX	136/140	132
4	84		4qter			
5	15	26,6	D5Mit387	HEX	176	184
5	20	33,9	D5Mit352	FAM	111	**119**/124
5	42	74,3	D5Mit201	HEX	111	118/**120**
5	59	?	D5Mit314	HEX	119	121
5	81	?	D5Mit101	TET	131	117
5	92		5qter			

Chro-mosom	Genetische Position [cM]	Physikalische Position [Mb]	Marker	Fluorochrom	Fragmentlänge für C57BL/6J	Fragmentlänge für PL/J
6	20,5	?	D6Mit274	FAM	114	93
6	41,5	98,4	D6Mit67	HEX	152	**156**
6	71,3	146	D6Mit14	HEX	159	**149**/157
6	75		6qter			
7	11	21,2	D7Mit267	HEX	197	183
7	24,5	37,7	D7Mit69	FAM	237	**231**/239
7	41	72	D7Mit350	NED	122	143
7	53,3	103,2	D7Mit98	HEX	175	169
7	74		7qter			
8	15	31,7	D8Mit63	HEX	210	228
8	33	70,1	D8Mit178	FAM	149	160
8	49	102,2	D8Mit211	HEX	153	168
8	67	124,1	D8Mit91	TET	147	145
8	82		8qter			
9	17	37,4	D9Mit2	FAM	172	167
9	29	50,3	D9Mit71	TET	115	103
9	42	73,8	D9Mit123	NED	152	156
9	53	98,8	D9Mit355	HEX	119	129
9	65	117,5	D9Mit201	NED	106	96
9	79		9qter			
10	11	20,1	D10Mit213	HEX	148	134
10	17	24,3	D10Mit86	TET	156	150
10	62	114	D10Mit233	TET	128	98/**106**
10	65	118,2	D10Mit14	FAM	192	186/**197**
10	77		10qter			
11	17	36	D11Mit231	HEX	103	**82**/118
11	29	54,2	42.MMIL4G12F	HEX	108	106
11	55	95,7	D11Mit289	NED	127	133
11	77	119	D11Mit48	TET	134	128
11	80		11qter			
12	16	28,9	D12Mit60	FAM	145	131
12	38	77,3	D12Mit158	TET	154	137/**156**
12	50	?	D12Mit7	TET	106	124
12	66		12qter			
13	10	21,4	D13Mit135	FAM	147	157
13	35	55,6	D13Mit13	FAM	147	141
13	48	92,5	D13Mit144	NED	120	124
13	65	109,1	D13Mit260	FAM	112	96
13	75	115,6	D13Mit78	FAM	227	205
13	80		13qter			
14	20,5	?	D14Sfk3	FAM	141	146
14	48	91,2	D14Mit106	HEX	319	313
14	54	?	D14Mit75	FAM	180	**167**/188
14	69		14qter			

Chro-mosom	Genetische Position [cM]	Physikalische Position [Mb]	Marker	Fluorochrom	Fragmentlänge für C57BL/6J	PL/J
15	15	?	D15Mit252	NED	123	117
15	40,9	70,4	D15Mit67	NED	192	184
15	49	84,7	D15Mit107	TET	150	147
15	55,6	90,7	D15Mit242	FAM	100	87
15	81		15qter			
16	3,4	5,2	D16Mit107	HEX	204	206
16	23,4	32,5	D16Mit60	FAM	203	209
16	43,1	66,1	D16Mit139	HEX	149	**154**/174
16	56,8	88,2	D16Mit153	NED	270	274
16	72		16qter			
17	22,9	?	D17Mit51	FAM	155	151
17	34,3	55,6	D17Mit20	FAM	177	165/**181**
17	45,3	72,8	D17Mit39	HEX	106	84/**89**
17	51,9	81,7	D17Mit122	NED	146	150
17	81,6		17qter			
18	22	43,9	D18Mit194	HEX	123	117
18	45	72,5	D18Mit186	FAM	124	106
18	60		18qter			
19	15	21,1	D19Mit96	HEX	122	111
19	34	36,6	D19Mit88	TET	146	140
19	55,7		19qter			
X	14,5	36,2	DXMit105	HEX	152	150
X	29,5	56,6	DXMit119	TET	144	156
X	45	91,1	DXMit64	FAM	133	**114**
X	73,3	147,3	DXMit223	FAM	104	108
X	91		Xqter			

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Karin Scharffetter-Kochanek für die Überlassung des Themas dieser Arbeit bedanken. Für ihre Unterstützung und ihr Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die zahlreichen wertvollen Ratschläge und Diskussionen bin ich ihr zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg danke ich für die Möglichkeit, in der Hautklinik der Universität zu Köln arbeiten zu können.

Bei Frau Priv.-Doz. Dr. Roswitha Nischt möchte ich mich für die freundliche Unterstützung und ihre Ratschläge bedanken und dafür, dass sie sich als Betreuerin meiner Dissertation zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Prof. Dr. Jens Brüning danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Cord Sunderkötter, Prof. Dr. Rikard Holmdahl, Prof. Dr. Stephan Grabbe und Dr. Werner Müller bin ich für ihre Ratschläge und die Aufnahme in ihre Labors im Rahmen von Kooperationen zu großem Dank verpflichtet. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei Dr. Anna-Karin Lindqvist, Eva Nattkämper und Karin Fischer für das Einarbeiten in verschiedene Methoden und ihre Unterstützung besonders bedanken.

Allen Mitarbeitern der Laboratorien der Hautklinik zu Köln möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und die große Hilfsbereitschaft danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Karin Scharffetter-Kochanek. Die angenehme Arbeitsatmosphäre hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Jan Zamek, Herrn Dr. Thorsten Peters und Frau Christina Hommel möchte ich mich für ihre Freundschaft und große Unterstützung herzlich bedanken. Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Meinhard Wlaschek für seine freundschaftlichen Ratschläge, aber auch kritischen Anmerkungen, insbesondere bei der Durchsicht des Manuskriptes dieser Arbeit.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Roswitha Nischt betreut worden.

Köln/Ulm, den 28.04.2004

Teilpublikationen:

Kess, D., T. Peters, J. Zamek, C. Wickenhauser, S. Tawadros, K. Loser, G. Varga, S. Grabbe, R. Nischt, C. Sunderkötter, W. Müller, T. Krieg und K. Scharffetter-Kochanek. 2003. CD4+ T cell-associated pathophysiology critically depends on CD18 gene dose effects in a murine model of psoriasis. *J Immunol* 171:5697-5706.

Kurzzusammenfassung

Bei CD18 hypomorphen PL/J-Mäusen mit einer Reduktion der CD18- (β_2-Integrin-) Expression auf 2 – 16 % der Wildtypmenge kommt es zum Auftreten einer psoriasiformen Hauterkrankung. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Psoriasis vulgaris könnte das CD18 hypomorphe PL/J-Mausmodell auch zur Aufklärung der pathogenetischen Vorgänge beim Menschen beitragen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der verminderten CD18-Genexpression auf die T-Zellfunktion und ihr Beitrag zu der Pathogenese dieser Dermatitis untersucht. Immunhistologische Färbungen zeigten, dass die Anzahl an $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in der Haut betroffener CD18 hypomorpher Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant erhöht ist. $CD4^+$ T-Zellen aus die Haut dränierenden Lymphknoten waren aktiviert und produzierten vermehrt die Th1-Schlüsselzytokine IFN-γ, IL-2 und IL-12. Die Depletion von $CD4^+$, nicht aber von $CD8^+$ T-Zellen, führte zu einer vollständigen Abheilung der psoriasiformen Dermatitis. Dies deutet auf eine zentrale Rolle der $CD4^+$ T-Zellen bei der Pathogenese dieser Erkrankung hin, die unabhängig von $CD8^+$ T-Zellen ist. Im Gegensatz zu CD18 hypomorphen PL/J-Mäusen entwickelten CD18-Nullmutanten desselben Stammes keinen psoriasiformen Phänotyp. Dies ist zum Teil durch das Fehlen der T-Zellauswanderung aus Blutgefäßen der Haut zu erklären. Eine allergische Kontaktdermatitis konnte bei CD18 hypomorphen und Wildtyp-Mäusen, aber nicht bei CD18-Nullmutanten ausgelöst werden. Daher reicht eine CD18-Genexpression von 2 - 16 % zur T-Zellauswanderung aus, die letztendlich zum entzündlichen Phänotyp CD18 hypomorpher PL/J-Mäuse führt.

Durch Rückkreuzung zwischen dem für die psoriasiforme Dermatitis suszeptiblen PL/J- und dem resistenten C57BL/6J-Stamm und anschließende Kopplungsanalysen konnten außerdem Chromosomenabschnitte mit Genen identifiziert werden, die zusätzlich zur hypomorphen CD18-Mutation für die Manifestation der Hauterkrankung verantwortlich sind. Genorte auf den Chromosomen 10 und 6 zeigten Kopplung und Bereiche auf den Chromosomen 1, 4 und 18 mögliche Kopplung mit dem psoriasiformen Phänotyp.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die pathogene Beteiligung der $CD4^+$ T-Zellen an der psoriasiformen Dermatitis CD18 hypomorpher PL/J-Mäuse von einem Gendosiseffekt mit einer verminderten Expression des CD18-Proteins abhängt. Die weitere Auklärung der Pathogenese und die Identifizierung mit der Erkrankung assoziierter Gene in diesem Mausmodell könnten generell zum besseren Verständnis polygener entzündlicher Erkrankungen des Menschen beitragen.

Abstract

A CD18 hypomorphic polygenic PL/J mouse model with severe reduction of CD18 (β_2 integrin) to 2 - 16 % of the wild-type results in the development of a psoriasiform skin disease. Resembling human psoriasis it might contribute in elucidating the mechanisms taking place in the human disease. In this study the influence of reduced CD18 gene expression on T cell function and its contribution to the pathogenesis of the psoriasiform dermatitis were analysed. On immunohistochemistry $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were significantly increased in the skin of affected CD18 hypomorphic compared to wild-type mice. $CD4^+$ T cells from skin draining lymph nodes were activated and produced increased amounts of Th1 key cytokines IFN-γ, IL-2 and IL-12. Depletion of $CD4^+$ T cells, but not of $CD8^+$ T cells, resulted in a complete resolution of the severe psoriasiform dermatitis indicating a central role of $CD4^+$ T cells in the pathogenesis of the disease, which is independent of $CD8^+$ T cells. In contrast to the CD18 hypomorphic PL/J mice, CD18 null mutants of the same strain did not develop psoriasiform dermatitis. This is in part due to a lack of T cell emigration from blood vessels of the skin, as after oxazalone challenge, allergic contact dermatitis could be induced in CD18 hypomorphic and wild-type mice but not in CD18 null mutants. Hence, 2 - 16 % of CD18 gene expression is obviously sufficient for T cell emigration, finally driving an inflammatory phenotype in CD18 hypomorphic PL/J mice.

Linkage analysis of a backcross between PL/J mice susceptible for the psoriasiform dermatitis and resistant C57BL/6J mice led to the identification of chromosomal regions harbouring genes apart from the hypomorphic CD18 mutation responsible for the manifestation of the skin disease. Gene loci on chromosomes 10 and 6 show linkage and loci on chromosomes 1, 4 and 18 suggestive linkage for the psoriasiform phenotype.

These results suggest that the pathogenic involvement of $CD4^+$ T cells in the psoriasiform dermatitis of CD18 hypomorphic PL/J mice depends on a gene dose effect with reduced expression of the CD18 protein. By further elucidating the pathogenesis and by identifying genes associated with the disease this mouse model may have general relevance to polygenic human inflammatory diseases.

Daniel Keß
Haselbühl 51
89075 Ulm

Lebenslauf

Geburtsdatum / -ort: 13/05/1971 in Bad Kissingen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:	09/1977 - 07/1981	Henneberg Volksschule Garitz
	09/1981 - 06/1990	Gymnasium Bad Kissingen
	06/1990	Allgemeine Hochschulreife
Bundeswehr:	07/1990 - 06/1991	Wehrdienst in der Bundeswehrkaserne Mellrichstadt
Studium:	10/1991 - 02/1998	Studiengang Diplombiologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	09/1996 - 10/1996	Diplomprüfung
	11/1996 - 02/1998	Diplomarbeit im Fach Biochemie mit dem Thema: „Der Einfluß verschiedener Retinoide auf Differenzierung, Proliferation und Motilität humaner Gliomzellen“ angefertigt in der Abteilung Tumorbiologie der Neurochirurgischen Klinik der Universität Würzburg
	11/1998 - 06/1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Kinderonkologie der Kinderklinik der Universität zu Köln
	seit 09/1999	Doktorarbeit mit dem Thema: „Genetische und zelluläre Analyse der Pathogenese des psoriasiformen Phänotyps im CD18 hypomorphen Mausmodell“ bearbeitet in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln
Auslandsaufenthalt:	04/2003 - 11/2003	Forschungsaufenthalt bei Prof. Rikard Holmdahl in der Abteilung Medical Inflammation Research am Institut für Zell- und Molekularbiologie in Lund, Schweden