

**Die Pathogene Rolle der Hautmakrophagen in
einem Mausmodell mit einer Keratinozyten-
induzierten und TNF-vermittelten Psoriasis-
ähnlichen Hautentzündung**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Athanasios Stratis
aus Oldenburg in Oldenburg

Köln

2007

Berichterstatter: **Prof. Dr. Jens Brüning**
Priv.-Doz. Dr. Roswitha Nischt

Vorsitzender: **Prof. Dr. Siegfried Roth**

Tag der mündlichen Prüfung: **14. Juni 2007**

Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist und im allgemeinen ist es nicht der Fall.

Bertrand Russell (1872-1970), brit. Philosoph u. Mathematiker, 1950 Nobelpr. f. Lit.

Für meine Familie

1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Haut	1
1.1.1 Die Haut	1
1.1.2 Subcutis	1
1.1.3 Dermis	1
1.1.4 Epidermis	2
1.1.5 Terminale epidermale Differenzierung der Keratinozyten	4
1.1.6 Immunologische Funktion der Keratinozyten	5
1.2 Erkrankung der Haut mit fehlreguliertem Wachstum der Epidermis	6
1.2.1 Psoriasis (Schuppenflechte)	6
1.2.2 Klinische Erscheinungsform	7
1.2.3 Pathogenese der Psoriasis	8
1.2.4 Plattenepithelkarzinom (Spinalom) der Haut	10
1.2.5 Pathogenese des Plattenepithelkarzinoms	11
1.3 Phagozyten	13
1.3.1 Das Phagozytensystem	13
1.3.2 Aktivierung der Makrophagen	15
1.4 Der NF-κB (Nukleärer Faktor κB) Signaltransduktionsweg	17
1.4.1 Regulation der Gentranskription durch Transkriptionsfaktoren	17
1.4.2 NF- κ B	18
1.4.3 Die NF- κ B/Rel Transkriptionsfaktoren	20
1.4.4 I κ B (Inhibitor von NF- κ B)	20
1.4.5 IKK (Inhibitor κ B-Kinasekomplex)	21
1.4.6 NF- κ B und Tumorentstehung	23

1.5 Gen-Knock-out	24
1.5.2 Das Cre-loxP-Rekombinationssystem	25
1.5.3 Epidermis-spezifische Deletion von IKK2	26
1.6 Clodronat-Liposomen	28
1.7 DNA-Microarray Chip-Analyse	29
1.8 Zielsetzung	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Materialien	31
2.1.1 Chemikalien	31
2.1.2 Häufig verwendete Lösungen und Puffer	31
2.1.3 Kits und weitere Materialien	32
2.1.4 Enzyme	32
2.1.5 Antikörper	32
2.2 Methoden	34
2.2.1 Mauszucht	34
2.2.2 Isolation der Epidermis aus der Maushaut	35
2.2.3 DNA-Isolation aus Mausschwänzen	35
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.5 Genotypisierung für Cre, IKK2, CD18-Mutation und IFN- γ -Rezeptor	36
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.7 Behandlung der K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäuse mit huTNFR:Fc	39
2.2.8 Behandlung der K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäuse mit Clodronat-Liposomen	39
2.2.9 Induktion der K14-Cre-ER ^{T2} Expression in K14-Cre-ER ^{T2} /IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	40

2.2.10 Immunfluoreszenzfärbungen von Differenzierungsmarkern in der Maushaut	40
2.2.11 Immunfluoreszenzfärbungen der Immunzellen in der Maushaut	41
2.2.12 Färbung der Maushaut mit dem Proliferationsmarker Ki-67	42
2.2.13 HE-Färbung (Hämatoxylin/Eosinfärbung)	43
2.2.14 Chloracetat-Esterase-Färbung	43
2.2.15 Färbung von pERK und pSTAT3 in Maushaut	43
2.2.16 Blutausstrich und Auswertung der weißen Blutkörper	44
2.2.17 Isolierung der RNA aus Hautzellen	44
2.2.18 Affymetrix Gene Chip Analyse	45
2.2.19 Herstellung der Proteinproben für die Western Blot Analyse aus der Maushaut	45
2.2.20 Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteinextrakte	46
2.2.21 Immundetektion von Proteinen	46

3 Ergebnisse **47**

3.1 Lokalisierte entzündliche Hauterkrankung durch induzierte oder spontane Deletion von I kappa B Kinase 2 (IKK2) in der Epidermis der Maus	47
3.1.1 Tamoxifen induzierte Deletion von IKK2 in der Mausepidermis	47
3.1.2 Spontan induzierte, Cre-vermittelte Deletion von IKK2 und die Entstehung von Hautläsionen in K14-Cre-ER ^{T2} /IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	47
3.1.3 Tamoxifen induzierte Deletion von IKK2 in der Epidermis von K14-Cre-ER ^{T2} IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	50
3.1.4 Histopathologische Untersuchung der Hautläsionen von K14-Cre-ER ^{T2} /IKK2 ^{FL/FL}	52
3.1.5 Immunhistologische Analyse der Entzündungszellen in der Haut von K14-Cre-ER ^{T2} /IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	54

3.1.6	Gestörte Proliferation und epidermale Differenzierung in K14-Cre-ER ^{T2} /IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	56
3.1.7	Haarfollikelschädigung aber keine Bildung von Tumoren in der Haut von K14-Cre-ER ^{T2} /IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	58
3.1.8	Signale der Hyperproliferation in epidermalen Keratinozyten bei K14-Cre-ER ^{T2} IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	61
3.2	Pathogene Rolle von Immunzellpopulationen und Zytokine in K14-Cre-IKK2^{FL/FL} Mäusen	63
3.2.1	Abschwächung des entzündlichen Hautphänotyps in K14-Cre-IKK2 ^{FL/FL} Mäusen durch die Hemmung von TNF	63
3.2.2	Untersuchung der Immunzellpopulationen in der Haut von K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	66
3.2.3	Charakterisierung der Makrophagen in der Haut von K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	66
3.2.4	Depletion der Makrophagen in der Haut von K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäusen durch die Injektion von Clodronat Liposomen	69
3.2.5	Erhöhte Anzahl von unreifen Granulozyten in den K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	75
3.2.6	Hemmung der Migration der Granulozyten in die Dermis von K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäusen durch gezielte Deletion von CD18	76
3.2.7	Effekt von Clodronat-Liposomen auf Mastzellen in der Dermis von K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	80
3.2.8	Affymetrix Genexpressions-Analyse der Haut von K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäusen zeigt eine verstärkte Expression von IFN- γ regulierten Proteinen	81
3.2.9	Gezielte Deletion des IFN- γ -Rezeptors	83

4 Diskussion	86
4.1 Induzierte IKK2-Deletion in der Epidermis von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen	86
4.1.1 Bildung epidermaler Zellaggregate in der Dermis von K14-Cre-ER ^{T2} IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	87
4.1.2 Entwicklung eines psoriasis-ähnlichen Hautphänotyps in den K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} und K14-Cre-ER ^{T2} /IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	88
4.2 Pathogene Rolle der Immunzellen und Zytokine bei der psoriasis-ähnlichen Hauterkrankung in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse	89
4.2.1 Die Rolle der T-Lymphozyten in der Pathogenese der Psoriasis und in den psoriasis-ähnlichen Hautmodellen	89
4.2.2 Die Rolle der Hautmakrophagen in der von Keratinozyten ausgelösten Psoriasis-ähnlichen Entzündung in K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	91
4.2.3 Einfluss der Granulozyten auf den psoriasis-ähnlichen Phänotyp der K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäuse	93
4.2.4 Die Bedeutung der Zytokine TNF und IFN- γ für die Entwicklung des psoriasis-ähnlichen Phänotyps in K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} Mäusen	94
4.2.5 Kommunikation zwischen Keratinozyten und Immunzellen in dem psoriasis-ähnlichen Phänotyp der K14-Cre/IKK2 ^{FL/FL} und K14-Cre-ER ^{T2} /IKK2 ^{FL/FL} Mäuse	97
5 Zusammenfassung-Abstract	101
5.1 Zusammenfassung	101
5.2 Abstract	103

6	Abkürzungsverzeichnis	105
7	Literaturverzeichnis	107

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

1.1.1 Die Haut

Die Haut ist das größte Organ des Körpers bei Säugetieren. Sie ist in erster Linie ein Grenzorgan zwischen Innen- und Außenwelt. Damit übernimmt die Haut eine Schutzfunktion gegenüber mechanischen, chemischen und thermischen Reizen. Sie bietet ebenso Schutz vor energiereicher Strahlung (z.B. UV-Strahlung) und bildet eine Barriere gegen Bakterien und Viren. Gleichzeitig ist sie ein Sinnesorgan, das über Rezeptoren Druck, Wärme und Kälte wahrnimmt und über die Schweißsekretion an der Thermoregulation und am Elektrolythaushalt beteiligt ist.

Die Haut wird unterteilt in:

- **Subcutis** (Unterhaut, Tela subcutanea)
- **Cutis** :
 - Dermis (Lederhaut)
 - Epidermis (Oberhaut)

Je nach Funktion sind die einzelnen Bereiche regional unterschiedlich ausgeprägt.

1.1.2 Subcutis

Die Subcutis besteht aus lockerem Bindegewebe mit vielen univakuolären Fettzellen. Sie verbindet die Haut mit den darunterliegenden Strukturen wie z.B. Knochenhaut und Muskulatur. Durch die Subcutis verlaufen die Nerven und Gefäße zur Haut.

1.1.3 Dermis

Die Dermis ist das unter der Epidermis gelegene Bindegewebe und bildet das Grundgerüst der Haut. Sie beherbergt versorgende Gefäße und Nerven, sowie

Schweiß- und Talgdrüsen. Die Kollagenfasern, die sich aus Kollagenfibrillen zusammensetzen, sind die wichtigsten Fasern in der Dermis. Sie bilden ein Netzwerk, welches parallel zur Hautoberfläche ausgerichtet ist. Das Prokollagen wird intrazellulär in den Fibroblasten gebildet. Extrazellulär wird durch enzymatische Abspaltung terminaler Peptide Kollagen gebildet. Das Kollagen wird zu Fibrillen vernetzt, die wiederum zu Kollagenfasern aggregieren.

Die Dermis ist in das oberflächliche schmale Stratum papillare und das breite Stratum reticulare unterteilt. Im Stratum papillare kommt der Kollagen-Typ-VII vor. Dieser Typ verankert die Dermis mit der Basalmembran und stellt so eine Verbindung mit der Epidermis her. Im Stratum reticulare sind vorwiegend die kräftigen Kollagen-Typ-I Faserbündel vorhanden. Sie bilden ein dichtes Kollagenfasergeflecht, das mit elastischen Netzen (Elastin, Fibrillin) durchsetzt ist und der Haut Reißfestigkeit und Verformbarkeit verleiht.

Den größten Anteil der dermalen Zellen bilden die Fibroblasten. Die Fibroblasten synthetisieren die Fasern und die Matrix der Dermis. Daneben sind auch Histiozyten vorhanden, deren Vorläufer, die Monozyten, aus der Blutbahn in die Dermis einwandern. Die Makrophagen sind die aktive phagozytierende Form der Histiozyten. Sie phagozytieren abgestorbene Zellen, Abbaustoffe wie Fette, Melanin und Proteine, produzieren Interferon und TNF (Tumornekrosefaktor) (Mosser, 2003), speichern Antigene und nehmen an immunologischen Reaktionen teil. Mastzellen sind ebenfalls über die gesamte Dermis verteilt. Die charakteristischen Granula enthalten unter anderem Histamin, Heparin und Serotonin (spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen in der Dermis), sowie Wachstumsfaktoren. Daneben kommen in einer geringen Zahl auch Melanozyten vor.

1.1.4 Epidermis

Die Epidermis macht 3 % der gesamten Hautdicke aus. Sie besteht aus einem mehrschichtigen, verhornten (keratinisierten) Plattenepithel. Sie ist ein klassisches Proliferationsgewebe und unterliegt somit einer dauernden Erneuerung. Die Keratinozyten stellen mit ihren verschiedenen Differenzierungsformen über 90 % des Parenchyms der Epidermis dar.

Daneben gibt es eine geringe Zahl von Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und T-Lymphozyten.

Die Epidermis besteht aus 4 Schichten:

- Stratum basale
- Stratum spinosum
- Stratum granulosum
- Stratum corneum

Die Keratinozyten durchlaufen eine terminale Differenzierung über diese Schichten und verändern während ihrer Wanderung Morphologie und Funktion (Verhornung). Die verschiedenen Schichten sind somit durch einen unterschiedlichen Entwicklungszustand der Keratinozyten gekennzeichnet.

Das Stratum basale ist die Grenzschicht zwischen Epidermis und Dermis. Sie besteht aus kubischen Zellen mit großen Kernen und relativ wenig Zytoplasma. Die Basalzellen sind durch Desmosomen an benachbarte Zellen und durch Hemidesmosomen an der Basalmembran verankert. Etwa 5 % der basalen Keratinozyten sind Stammzellen, die durch mitotische Teilung die verhornenden Zellen ersetzen.

Darüber befindet sich das aus zwei bis fünf Zellschichten bestehende Stratum spinosum, in dem die Keratinozyten größer werden und in den höheren Schichten abflachen. Wegen der multiplen, lichtmikroskopisch stachelartig erscheinenden Interzellularbrücken (Desmosomen) unter den Zellen, wird diese Schicht auch Stachelzellschicht genannt.

Darauf folgt das Stratum granulosum, dessen Name von den zahlreichen Granula in den Keratinozyten abgeleitet wird. Das Stratum granulosum besteht aus zwei bis drei Zellschichten. Hier sind die Keratinozyten deutlich abgeflacht. Die Zellen beginnen im großen Umfang Loricrin, Filaggrin und Cystatin α zu synthetisieren und in Granula einzulagern, die später für die Bildung der Korneozytenmembran wichtig sind. Nach Auflösung ihrer Zellkerne und Zellorganellen durch Proteinasen, DNasen und anderen Enzymen erreichen sie das Stratum corneum.

Das Stratum corneum ist die oberste Hautschicht und besteht aus zehn bis zwanzig Zelllagen. Die terminal ausdifferenzierten, kernlosen, verhornten Keratinozyten werden in dieser äußersten Hautschicht auch Korneozyten genannt. Sie liegen plattenförmig flach und fest gepackt und sind über verhornte Desmosomen (Corneosomen) verbunden. Die Korneozyten besitzen ein ausgeprägtes Keratingerüst, um das sich eine stark quervernetzte Proteinhülle ausgebildet hat. Die unter der Zellmembran liegende Proteinhülle besteht vor allem aus den Strukturproteinen, die im Stratum granulosum gebildet wurden.

1.1.5 Terminale epidermale Differenzierung der Keratinozyten

Die Keratinozyten durchlaufen die terminale epidermale Differenzierung. Diese Differenzierung ist in ein Synthese-, Transformations-, und Terminalstadium unterteilt. Dabei sind die Keratine ein Hauptbestandteil der Keratinozytenstruktur während der terminalen Differenzierung. Etwa zehn Keratine sind für „harte“ Epithelschichten spezifisch und bilden Haare und Nägel. Etwa 20 weitere so genannte Zytokeratine werden normalerweise in den Epithelgeweben gefunden, mit denen die Körperhöhlen ausgekleidet sind. Man unterscheidet zwei Typen von Keratinen. Jedes Epithelgewebe exprimiert eine charakteristische Kombination von Keratinen der Typen I und II (Steinert, 1990; Fuchs et al., 1994). Den Typ I bilden die sauren Keratine (pH 4,8-5,7). Die basischen und neutralen Keratine (pH 5,8-8,0) repräsentieren den Typ II. Sie bilden stets Heterodimere im Verhältnis 1:1, die sich zu heteropolymeren Keratinfilamenten verbinden. Keiner der beiden Typen kann für sich allein Filamente bilden. Im Stratum basale wird vorwiegend Keratin 5 (Typ II) und Keratin 14 (Typ I) exprimiert. Sie bilden Heterodimere, die sich zu lockeren Bündeln zusammenlagern. Im Stratum spinosum wird die Synthese von Keratin 5/Keratin 14 eingestellt. Stattdessen beginnt die Expression von Keratin 1 (Typ II) und Keratin 10 (Typ I). Diese Heterodimere lagern sich zu Tonofibrillen zusammen und anschließend an das Keratin 5/Keratin 14 Netzwerk an. Im Stratum spinosum beginnt zusätzlich die Synthese des Strukturproteins Involucrin.

Die Expression der Strukturproteine Loricrin und Filaggrin beginnt im Stratum granulosum. Involucrin legt sich an die Innenseite der Zytoplasmamembran und bildet hauptsächlich mit Loricrin, Filaggrin und Cystatin α eine dichte quervernetzte Proteinhülle (Fuchs, 1990; 1993). Diese Proteinhülle bewirkt die starke Verhornung und Widerstandsfähigkeit der Keratinozyten im Stratum corneum. Die Strukturproteine werden durch die epidermale Transglutaminase, die ϵ -(γ -Glutamyl)-Lysin-Isopeptid-Brücken bildet (Steven et al., 1994), und Disulfidbrücken quervernetzt. Die Expression von Keratin 6 (Typ II) und Keratin 16 (Typ I) wird unter anderem bei Prozessen der Wundheilung in den suprabasalen Schichten der Epidermis ausgelöst (Mansbridge et al., 1987).

1.1.6 Immunologische Funktion der Keratinozyten

Das „Hautimmunsystem“ besteht aus verschiedenen Zelltypen. Es beinhaltet vornehmlich Hautmakrophagen, Langerhanszellen, Mastzellen, Leukozyten, vaskuläre Endothelzellen und Keratinozyten. Die Keratinozyten sezernieren und setzen Botenstoffe frei, die für die Immunantwort und Entzündungsvorgänge wichtig sind (Kupper et al., 1990; McKenzie et al., 1990; Barker et al., 1991) Nachfolgend sind einige von Keratinozyten produzierte Zytokine aufgelistet.

Zytokine:

- Interleukin-1 alpha (IL-1 α)
- Interleukin-1 beta (IL-1 β)
- Interleukin-3 (IL-3)
- Interleukin-6 (IL-6)
- Interleukin-8 (IL-8)
- Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)
- Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)
- Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)
- Tumour necrosis factor alpha (TNF- α)
- Hepatocyte stimulating factor III

Die Zytokine sind an der Initiation der Entzündung, Leukozytose (Vermehrung der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) im Blut) und der akuten Phase-Antwort beteiligt (McKenzie, 1990). IL-1 wird in Keratinozyten konstitutiv gebildet und in den Zellen gelagert. Das macht die Epidermis zu einem sehr großen Speicher für IL-1 (Kupper, 1988). Als primäres Ereignis der Hautabwehr setzen geschädigte Keratinozyten IL-1 frei. IL-1 stimuliert eine weitere Ausschüttung von IL-1 aus den benachbarten Keratinozyten um die IL-1 Antwort zu verstärken. Des Weiteren stimuliert IL-1 die Produktion von IL-8 (Baggiolini et al., 1989; Larsen et al., 1989;), IL-6 (Kupper et al., 1989) und GM-CSF (Kupper et al., 1987). Diese Zytokine sind Aktivatoren für pro-inflammatorische Zellen. IL-8 z.B. rekrutiert Neutrophile, Makrophagen und T-Zellen an ihren Bestimmungsort (Baggiolini et al., 1989; Larsen et al., 1989). TNF- α , das von IL-1 stimulierten Keratinozyten und Makrophagen freigesetzt wird, steigert die Immunantwort (Balkwill, 1989), sowie die MHC-Expression und Antigenpräsentation für die Lymphozyten (Fiero, 1987). Zusätzlich induzieren IL-1 und TNF- α die Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMS) an der Oberfläche von Endothelzellen und Fibroblasten (Dustin et al., 1986; Pober et al., 1986; Bevilacqua et al., 1989). Zirkulierende Leukozyten adhären durch die ICAMS an diesen Zellen. GM-CSF erhöht bei ausgereiften Granulozyten die Phagozytoseaktivität (Kupper, 1988). G-CSF verstärkt die Phagozytose von Neutrophilen und M-CSF die Zytotoxizität von ausgereiften Makrophagen (Clark, 1987).

1.2 Erkrankung der Haut mit fehlreguliertem Wachstum der Epidermis

1.2.1 Psoriasis (Schuppenflechte)

Die Psoriasis ist eine chronische und schubartig verlaufende entzündliche Hauterkrankung. Sie kann neben der Haut auch die Nägel und Gelenke befallen. In den westlichen Ländern sind etwa 2 % der Bevölkerung davon betroffen. Die Ursachen und Mechanismen sind bis heute weitgehend ungeklärt (Schon et al., 2005). Die Krankheit kann die Lebensqualität erheblich einschränken und neben dem physischen auch einen

psychosozialen Leidensdruck verursachen (Krueger et al., 2001). Die Psoriasis wird in zwei unterschiedliche Formen (Typ I und II) unterteilt. Die Erkrankung beginnt bei Psoriasis Typ I im Alter von 10-25 Jahren und zeigt einen schweren Krankheitsverlauf. Es besteht eine genetische Disposition, wobei es eine Verbindung zu bestimmten Allelen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC Major Histocompatibility Complex) gibt. Der MHC wird beim Menschen als HLA (Human Leukocyte Antigen-Komplex) bezeichnet. Dazu zählen die HLA-Allele B13, B17, B39, B57 und mit einer besonders hohen Assoziation zu Psoriasis die HLA-Allele Cw6 und DR7. Bei Trägern dieser Allele ist die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung erhöht (Barker, 2001). Der Typ II zeigt einen leichteren Krankheitsverlauf. Die Krankheit tritt erst im höheren Alter auf. Es zeigt sich keine familiäre Häufung und keine Assoziation zu den HLA-Allelen. An der Manifestation der Psoriasis sind endogene und exogene Faktoren beteiligt.

Die Auslöser sind:

- Mechanische Reize: Verletzungen, dauernde Reibung
- Chronische Schädigungen: z.B. häufige und intensive Reinigung, Sonnenbrand oder Verbrühungen
- Bakterielle Infekte: Mandelentzündungen, vor allem im Kindes- oder Jugendalter, langwierige Entzündungen innerer Organe (Blinddarm, Harnwege, Eierstöcke)
- Medikamente: Betablocker, ACE-Hemmer, Lithium, Malariamittel oder kortisonfreie Antirheumatika
- Stress, Alkohol, Nikotin und ein erhöhter Body Mass Index (Naldi et al., 2005)

1.2.2 Klinische Erscheinungsform

Die Psoriasis wird durch eine verdickte Haut und scharf begrenzte Plaques mit weiß-silbriger Schuppung charakterisiert. Der klinische Befund und das Ergebnis der Gewebeuntersuchung erlauben eine eindeutige Diagnose.

Die wichtigsten histologischen Kriterien sind:

- Hyperkeratose: Verdickung der Hornschicht
- Akanthose: Verdickung der Epidermis, Verlängerung und Verbreiterung der Retezapfen
- Parakeratose: Unvollständige Verhornung und mangelhafter Abbau der Zellbestandteile, unvollständiger Zellkernabbau
- Lymphozytäres und histiozytäres Infiltrat
- Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Epidermis, welche unterhalb des Stratum corneum so genannte Munro-Mikroabszesse bilden
- Stark erweiterte Gefäße in der Dermis
- Hypogranulose: Fehlen des Stratum granulosum

1.2.3 Pathogenese der Psoriasis

Die Psoriasis ist gekennzeichnet durch eine gestörte Differenzierung der Keratinozyten und eine Hyperproliferation. In einer gesunden Haut durchlaufen die Keratinozyten die Differenzierungsstadien in ca. vier Wochen. Bei der Psoriasis dagegen ist die Mitoserate stark erhöht (Vanscott et al., 1963). Das führt dazu, dass die Keratinozyten schneller durch die suprabasalen Schichten wandern und in einem niedrigeren Differenzierungsstadium verbleiben. Die Expression der Differenzierungs-assoziierten Keratine 1 und 10 ist vermindert, wohingegen in hyperproliferativen Keratinozyten die Proliferations-assoziierten Keratine 6 und 16 verstärkt gebildet werden (Rao et al., 1996). Die Enddifferenzierungsmarker Loricrin und Filaggrin sind nur schwach oder nicht mehr nachweisbar (Ishida-Yamamoto et al., 2000). Verschiedene Genorte auf unterschiedlichen Chromosomen werden mit Psoriasis assoziiert. Zu den Psoriasis-assoziierten Genorten gehören:

- PSORS₁ (psoriasis susceptibility locus) auf Chromosom 6p21.3,
- PSORS₂ auf 17q,
- PSORS₃ auf 4q,

- PSORS₄ auf 1cen-q21,
- PSORS₅ auf 3q21,
- PSORS₆ auf 19p
- PSORS₇ auf 1p
- PSORS₈ auf Chromosom 16q

Ein weiterer Kandidat könnte auf dem Chromosom 20p lokalisiert sein (Nair et al., 1997). Eine Hypothese geht davon aus, dass ein Antigen in den Keratinozyten, vermutlich im Zusammenhang mit HLA-Cw6, T-Zellen stimuliert und die Erkrankung initialisiert. Am auffälligsten scheint dabei der Genort PSORS₁ auf 6p21.3 zu sein. Er liegt im Bereich des MHC. Der Genort zeigt die größte Assoziation mit Psoriasis und unterstreicht die Assoziation der Psoriasis mit HLA-Cw6 (Trembath et al., 1997). Es werden aber auch weitere Gene wie z.B. Corneodesmosin oder HCR (alpha helical coiled-coil rod) diskutiert, die ebenfalls in diesem Bereich liegen und für die gestörte Keratinozytendifferenzierung verantwortlich gemacht werden könnten (Prinz, 2004). Durch klinische Beobachtungen und Betrachtung der bisherigen Daten und Hinweise wird vermutet, dass T-Zell-vermittelte Mechanismen bei der Psoriasis eine wichtige Rolle spielen könnten (Nickoloff et al., 2004). Allerdings sind andere Immunmechanismen in diesem Zusammenhang nur unvollständig untersucht. Wie oben bereits erwähnt, wird bei der T-Zell-Hypothese davon ausgegangen, dass T-Zellen durch ein bisher unbekanntes Antigen in den Keratinozyten stimuliert werden. Es wird diskutiert, ob es Kreuzreaktivitäten zwischen Proteinen in den Keratinozyten und bakteriellen Proteinen (sog. M-Proteine von Streptokokken) oder viralen Antigenen gibt (Prinz, 2004). Vielleicht sind auch bestimmte Gefahrensignale (siehe 1.2.1: Psoriasis (Auslöser)) nötig, um proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und Interferone (IFN), sowie Adhäsionsmoleküle zu induzieren, die dann möglicherweise eine autoreaktive T-Zell-Antwort auslösen. Die Theorie, dass T-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Psoriasis einnehmen, wird teilweise durch therapeutische Ansätze unterlegt. Bei einer Entzündungsreaktion werden von T-Zellen, dendritischen Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Keratinozyten, Endothelzellen und neuronalen Zellen proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , Chemokine wie

IL-8 und Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular endothelial growth factor) oder Neuropeptide freigesetzt. Diese Faktoren steigern die Proliferation von basalen Keratinozyten oder die Rekrutierung von weiteren proinflammatorischen Zellen. Bei der Psoriasis kommt es primär zu einer Ausschüttung von Zytokinen wie IL-12/IL-23 und IL-18, die in verschiedenen Zellarten wiederum Zytokine wie TNF- α und IFN- γ stimulieren (Nickoloff et al., 2004; Rosmarin et al., 2005). Deshalb zielen die neuesten Therapieansätze darauf ab, IL-12/IL-23 oder TNF- α zu blockieren. Die bisherigen Resultate weisen darauf hin, dass diese pleiotropen Zytokine ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Psoriasis spielen könnten (Tobin et al., 2005).

1.2.4 Plattenepithelkarzinom (Spinalom) der Haut

Das Plattenepithelkarzinom der Haut ist ein maligner Tumor. Er ist nach dem Basalzellkarzinom der zweithäufigste Hauttumor. In der weißen Bevölkerung beobachtet man eine schnelle Inzidenzzunahme (Glass et al., 1989; Weinstock, 1989; Marks, 1996; Gray et al., 1997; Diepgen et al., 2002). Die Gefahr, an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken, steigt ab dem 40. Lebensjahr und ist am höchsten im Alter zwischen 70 und 80 Jahren. Plattenepithelkarzinome sind möglicherweise die Folge der über die Gesamtlebensdauer summierten karzinogenen Noxen. Hauptsächliche Faktoren sind UV-Schädigung, Röntgenstrahlung sowie chemische Faktoren wie z.B. Teer, Kohlenwasserstoffe, Mineralöle und Arsen. Durch diese Karzinogene wird die DNA geschädigt. Wird die Kapazität der Reparationsmechanismen qualitativ und/oder quantitativ überschritten, entstehen durch somatische Mutation maligne Zellen. Das größte Risiko stellen lichtgeschädigte Hautareale mit aktinischen Keratosen dar (Mittelbron et al., 1998). Speziell der UVB-Anteil des UV-Lichts ist dafür verantwortlich, dass im Zellkern unter anderem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere gebildet werden, die bei ausbleibender Reparatur Mutationen bewirken (Grossman et al., 1997). Aktinische Keratosen sind hautfarbene bis rötliche, fest haftende Rauigkeiten der Haut, aus denen Plattenepithelkarzinome hervorgehen können (Salasche, 2000). Aktinische Keratosen werden heute als Vorstufe oder sogar als frühe Stadien eines Plattenepithelkarzinoms gesehen. Weitere Faktoren, die einen

solchen Tumor begünstigen können, sind chronische Entzündungen, Wunden, Narben und Verbrennungen (Motley et al., 2002). Vor allem chronische Entzündungen begünstigen eine Entstehung von Metaplasien und dadurch die Bildung von Karzinomen. Durch fehlreguliertes Wachstum entsteht aus einer malignen Zelle ein maligner Zellklon und somit ein Karzinom. Durch Zelltod (Apoptose) werden etwa 80-90 % der malignen Klone beseitigt. 10-20 % der malignen Klone dagegen persistieren und bilden Karzinome. Plattenepithelkarzinome bestehen anfänglich aus unauffälligen, gelb-graubraunen, keratotischen Plaques. Diese Plaques entwickeln sich zu exo- und endophytischen Tumoren. Plattenepithelkarzinome sind histopathologisch solide, epitheliale Tumore mit Verhornungstendenz oder mit Ulzeration. Sie bilden von der Epidermis ausgehende, unregelmäßig geformte und verzweigte Tumorstränge aus. Morphologische Charakteristika sind atypische Mitosen, Polyploidie, Kernhyperchromasie und -hyperplasie.

1.2.5 Pathogenese des Plattenepithelkarzinoms

Nach aktuellem Wissenstand geht man davon aus, dass die Plattenepithelkarzinome aus den epidermalen Stammzellen der interfollikulären Epidermis hervorgehen. Dabei kommt es anfänglich durch eine genetische Alteration zu einer klonalen Expansion der Zellen. Diese Expansion erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die nachfolgenden Zellen zusätzlich weitere genetische Veränderungen erfahren, die dann zum malignen Tumorwachstum führen. Die ersten genetischen Veränderungen, die zu Plattenepithelkarzinomen führen können, sind die P₅₃-Mutationen (P₅₃-Tumorsuppressorgen). P₅₃ reguliert die Expression der Gene, die wichtig für Zellzykluskontrolle, Apoptose und DNA-Reparatur sind. Eine Mutation im p53-Gen kann zu einem Funktionsverlust des Enzyms führen. Die Apoptose und DNA-Reparatur kann nicht mehr eingeleitet werden und es kann dadurch zu einem unkontrollierten Wachstum DNA geschädigter Zellen kommen. Die Mutationen werden in der Regel durch UV-Strahlung ausgelöst. Sie können bereits in klinisch unauffälliger Haut nachgewiesen werden. Etwa 80 % der aktinischen Keratosen weisen eine P₅₃-Mutation auf (Grossman et. al, 1997). Ein weiterer Schritt in der Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms sind

Mutationen in den Protoonkogenen der Ras-Familie, insbesondere bei K-Ras und H-Ras. Ras ist wichtig für Signaltransduktionswege, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren. In aktivierter Form ist Ras an GTP (G-Protein) gebunden. Wird das GTP zu GDP hydrolysiert, ist Ras inaktiv. Punktmutationen führen zu einem Verlust der GTPase-Aktivität von Ras. Der Wechsel zur GTP-gebundenen Form wird dadurch blockiert und es kommt zu einer Akkumulation von aktiviertem Ras, was zu einem permanenten Wachstumssignal in den Zellen und letztendlich zu Tumoren führt (Tsao, 2001; Dlugosz et al., 2002). Des Weiteren zeigen die Karzinome Allelverluste auf den Chromosomenarmen 17p, 17q, 9p, 3p und 13q (Tsao, 2001).

Auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p21) wurde die Inaktivierung des CDKN_{2A}-Tumorsuppressorgens (cyclin dependent kinase 2a) festgestellt. Diese Inaktivierung wurde als weitere Veränderung im Fortschritt der Plattenepithelkarzinome identifiziert (Dlugosz et al., 2002; Mortier et al., 2002). In den Karzinomen findet man häufig zusätzlich eine Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) (Dlugosz et al., 2002). Untersuchungen weisen darauf hin, dass die verstärkte Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors wahrscheinlich zum Metastasierungspotential der Tumore beiträgt (Shimizu et al., 2001). Klinische Studien legen nahe, dass auch durch humanpathogene Papillomviren (HP-Viren) Plattenepithelkarzinome ausgelöst werden können. Unter den Viren, die die Haut befallen können, stellen die HP-Viren eine große Gruppe dar. In vielen gutartigen und tumorähnlichen Veränderungen in der Haut und in Schleimhautveränderungen konnte Virus-DNA oder Virusprotein nachgewiesen werden. Zu diesen Veränderungen zählen z.B. Viruswarzen, epitheliale Zysten, orolaryngeale und pharyngeale Papillome und Keratoakanthome (Melton, 1991; Weber, 1994; zur Hausen, 1996). Die Umstände von der Infektion bis zur Entartung der Zelle sind noch nicht genau bekannt. Vermutlich spielt das Virusgen E2 eine Rolle, das auf eine unbekannte Weise das p53-Tumorsuppressorgen inaktiviert (Majewski et al., 1995).

1.3 Phagozyten

1.3.1 Das Phagozytensystem

Die Epithelien bilden für Erreger eine physische Barriere zwischen dem Körperinneren und der Außenwelt. Die äußere Grenzschicht der Haut bildet das Stratum corneum (siehe 1.1.4). Durch die Säureproduktion der Haut entsteht ein Säureschutzmantel mit einem pH-Wert von 5,5. Der Säureschutzmantel wird durch die Produktion von Fettsäuren, Lysozym (Tränen, Schweiß) und antibakteriellen Peptiden gebildet. Zusätzlich werden pathogene Mikroorganismen durch die normale Flora nichtpathogener Mikroorganismen abgetötet oder in ihrem Wachstum gehemmt. Es entsteht eine Konkurrenz um Anheftungsstellen und Nährstoffe. Außerdem produzieren die nichtpathogenen Mikroorganismen der normalen Flora antimikrobielle Substanzen, die eine Besiedlung anderer pathogener Mikroorganismen verhindern. Besiedelt oder durchdringt ein Pathogen diese Barriere, ist die angeborene Immunität die erste Abwehrschranke für den Erreger. Zum Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems zählt das Phagozytensystem. Die zwei Hauptfamilien von Zellen und Mediatoren des angeborenen Immunsystems sind die Monozyten und Neutrophilen im Blut. Diese zwei Hauptfamilien der Phagozyten spielen in allen Phasen der Immunabwehr eine wichtige Rolle. Im Blut zirkulieren ständig Neutrophile und Monozyten. Treten die Monozyten aus dem Blut in das Gewebe über, reifen sie zu Makrophagen aus, die nach dem jeweiligen Gewebe bezeichnet werden:

- Histiozyten (Bindegewebe)
- Mikroglia (Zentralnervensystem)
- Kupfer-Zellen (Leber)
- Alveolarmakrophagen (Lunge)
- Osteoklasten (Knochen)

Die Phagozyten phagozytieren nicht nur opsonisierte Partikel, die durch Antikörper und/oder Komplementproteine gekennzeichnet sind. Ihre wichtigste Funktion ist vor allem Pathogene direkt zu erkennen und sie zu phagozytieren.

Im Laufe der Evolution haben Makrophagen und neutrophile Zellen mehrere Oberflächenrezeptoren entwickelt, die allgemein vorkommende Bausteine von bakteriellen Oberflächen erkennen und an diese binden. Es gibt viele Rezeptoren für konservierte Oberflächenmoleküle, die essentiell für die mikrobiellen Zellfunktionen sind. Diese Muster werden Pathogen-assoziierte-Molekularmuster (PAMPs) genannt. Die Rezeptoren der Abwehrzellen, die PAMPs erkennen, sind die so genannten pattern recognition receptors (PRRs). Sie können mit den Komplementrezeptoren, mit denen sie opsonisierte Partikel aufnehmen, auch verschiedene Bestandteile der Erreger erkennen.

Sie sind in drei Gruppen eingeteilt:

- Sezernierende Rezeptoren: Dazu gehört unter anderem das Mannosebindende Lektin (MBL) auf Makrophagen und dendritischen Zellen. Das Protein wird als Akutphaseprotein in der Leber sezerniert. Es ist ein IgM-Analogon, welches das Komplement C1q aktivieren kann.
- Endozytische Rezeptoren: Zu den endozytischen Rezeptoren gehört der auf den Makrophagen vorkommende Mannoserezeptor, sowie der scavenger-Rezeptor, der viele Sialinsäureliganden bindet.
- Rezeptoren der Toll-Familie, die Toll like Rezeptoren (TLR): Darunter fallen z.B. TLR4 für Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien, TLR2 für Peptidoglykane grampositiver Bakterien und Glykopeptide von Mykobakterien.

Auf diese Weise werden die meisten Pathogene, die eine Epithelbarriere überwinden, von Phagozyten sofort erkannt. Residente Gewebemakrophagen sowie zirkulierende Neutrophile und Monozyten binden an das Pathogen. Die gebundenen Erreger werden phagozytiert und durch intrazelluläre oxidative Mechanismen abgebaut. Dabei kommt es zur Anreicherung im Phagolysosom (Dorn et al., 2002) sowie zur Synthese reaktiver Sauerstoffmoleküle (oxidative burst) durch NADPH-Oxidasen und Erzeugung von NO durch die induzierbaren NO-Synthasen (iNOS) (Ischiropoulos et al., 1992).

Um Pathogene aufzunehmen, müssen Granulozyten und Monozyten aus den Gefäßen in die Dermis übertreten. Der Vorgang, durch den die Leukozyten aus dem Blutstrom durch die Blutgefäße in die benachbarten Gewebe wandern, wird Diapedese genannt (Springer, 1994; Springer, 1995). Der erste Schritt wird durch die Adhäsionsrezeptoren der Selektinfamilie vermittelt. Die Selektine erkennen auf den Leukozyten Kohlenhydratepitope bestimmter Glykoproteine mit denen sie in Wechselwirkung treten. Die Bindung ist jedoch zu schwach, um den Scherkräften des Blutstroms entgegenzuwirken. Deshalb „rollen“ die Leukozyten am Endothel entlang, indem fortwährend neue Verbindungen ausgebildet und alte wieder gelöst werden. Dieses „Rollen“ ermöglicht jedoch die Ausbildung von stärkeren Verbindungen der Lymphozyten mit dem Endothel. Induzierte Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen wie z.B. ICAM-1 (ebenfalls durch TNF- α induziert) und die Aktivierung seiner Liganden LFA (CD11a:CD18) und Mac-1 (CD11b:CD18) auf den Leukozyten beenden das „Rollen“ durch eine stabilere Wechselwirkung. Bei der Durchquerung der Leukozyten durch das Endothel sind die Leukozytenintegrine LFA und Mac-1, sowie PECAM (Platelet/endothelial cell adhesion molecule), welches sowohl auf den Leukozyten als auch auf den Verbindungsstellen zwischen den Epithelzellen exprimiert wird (Newman, 1997), beteiligt. Diese Interaktionen ermöglichen den Phagozyten, durch die Endothelzellen zu migrieren und in die Dermis einzuwandern.

1.3.2 Aktivierung der Makrophagen

Nach heutigen Erkenntnissen werden aktivierte Makrophagen nicht mehr nur als einfache Zellen gesehen, die Entzündungsmediatoren sezernieren und intrazelluläre Pathogene phagozytieren. Man spricht vielmehr bei aktivierten Makrophagen von einer heterogenen Gruppe. Sie zeigen eine unterschiedliche Physiologie mit verschiedenen immunologischen Funktionen. Man kann die aktivierten Makrophagen in folgende drei Gruppen einteilen (Mosser, 2003).

Die erste Gruppe bilden die klassisch aktivierten Makrophagen:

Klassisch aktivierte Makrophagen werden durch TNF und IFN- γ aktiviert. Ihre phagozytische Funktion erlangen sie aber nur in Kombination mit Mikroben oder mikrobiellen Produkten wie LPS (Lipopolysaccharid) (Moser, 2003). Aktivierte Makrophagen zeigen eine gesteigerte Migration und eine erhöhte Pinozytose. Ebenso zeichnen sich aktivierte Makrophagen durch eine erhöhte Fähigkeit aus, Mikroorganismen zu töten und abzubauen. Die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und NO-Spezies steigt an. Dagegen zeigen sie eine reduzierte Expression des Mannoserezeptors und des Fc-Rezeptors für IgG (Fc γ RII) (Ezekowitz et al., 1984). Aktivierte Gewebemakrophagen können organisierte Ansammlungen bilden. Diese Makrophagen sind eine reiche Quelle pro-inflammatorischer Zytokine, toxischer Radikale und inflammatorischer Lipidmediatoren. Diese Produkte können beträchtliche Gewebeschäden erzeugen. Deshalb wird die Aktivität dieser Makrophagen reguliert, um eine unkontrollierte Zerstörung des Gewebes zu verhindern. Die immunregulatorischen Zytokine transforming growth factor (TGF β) und IL-10 spielen dabei eine wichtige Rolle. TGF β und IL-10 können durch die Makrophagen selbst oder durch umliegende Zellen produziert werden (Mosser, 2003). Knock-Out Mäuse, denen eines dieser Zytokine fehlt, sind sehr anfällig für entzündliche Krankheiten (Ho et al., 1994; Reed, 1999).

Die zweite Gruppe bilden die alternativ aktivierten Makrophagen:

Bei der Untersuchung des Mannoserezeptors auf Makrophagen wurde beobachtet, dass die Behandlung der Makrophagen mit IL-4 ein effizienter Weg ist, die Expression des Rezeptors zu induzieren (Stein et al., 1992). Diese Makrophagen spielen eine andere biologische Rolle als die klassisch aktivierten Makrophagen. Sie sind nicht in der Lage, reaktive NO-Spezies zu produzieren (Rutschman et al., 2001). Damit ist die Fähigkeit, intrazelluläre Mikroorganismen abzutöten kompromittiert. Obwohl sie einige MHC Klasse II Moleküle hochregulieren, sind sie bei der Antigenpräsentation nicht sehr effizient. In vielen Fällen hemmen alternativ aktivierte Makrophagen die T-Zell Proliferation (Schebesch et al., 1997). Eine besondere Rolle scheinen alternativ aktivierte Makrophagen in der Wundheilung zu spielen. Sie sind in der Lage, große Mengen von Fibronectin und Matrix-assoziierten Proteinen

herzustellen (Gratchev et al., 2001) und fördern die Fibrogenese (Song et al., 2000).

Die dritte Gruppe stellen die Typ II-aktivierten Makrophagen dar:

Der Name der Typ II-aktivierten Makrophagen wird von der Tatsache abgeleitet, dass sie vorzugsweise eine Th2 vermittelte Immunantwort induzieren. An aktivierten Makrophagen wurde festgestellt, dass die Besetzung des Immunglobulin G (IgG) Fc γ -Rezeptors (Fc γ Rs) die IL-12 Synthese ausschaltet (Schutterwala et al., 1997) und die Produktion von hohen IL-10 Mengen stimuliert (Schutterwala et al., 1998). Die Besetzung des Fc γ Rs muss mit einem Makrophagenstimulatorischen Signal gekoppelt sein, um die Zytokinproduktion zu verändern. Diese Signale werden durch die Stimulation der Toll like Rezeptoren, sowie durch CD40 oder CD44 ausgesendet. Klassisch aktivierte Makrophagen stimulieren T-Zellen zur Produktion von IFN- γ als Antwort auf ein Antigen. Typ II-aktivierte Makrophagen dagegen stimulieren T-Zellen zur Produktion von hohen Mengen an IL-4 (Anderson et al., 2002). IL-4 wiederum stimuliert B-Zellen zur Produktion von IgG1 als Antwort auf ein Antigen.

1.4 Der NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B) Signaltransduktionsweg

1.4.1 Regulation der Gentranskription durch Transkriptionsfaktoren

Zellen reagieren mit einer spezifischen Genexpressionsantwort auf Veränderungen (Stimuli) in ihrer Umgebung. Diese werden durch Rezeptoren in der Zellmembran bzw. im Zytosol wahrgenommen. Wird ein Oberflächenrezeptor aktiviert, führt dies zu einer komplexen Abfolge an Signalübertragungsvorgängen von der Zellmembran in den Zellkern. Dies geschieht durch eine Modifikation von "Vermittlern" (second messenger). Bei solchen Signaltransduktionskaskaden, die vom Stimulus zur Genexpression führen, bilden die Transkriptionsfaktoren das letzte Glied in dieser Kette. Transkriptionsfaktoren sind im Ruhezustand an inhibitorische Untereinheiten gebunden. Nach einer Aktivierung werden sie von ihren Untereinheiten getrennt. Dadurch verlagern sie sich in den Zellkern der Zelle und regulieren

die Transkription der Gene durch sequenzspezifische DNA-Bindung an regulatorische Promotor- und Enhancer-Einheiten. Dabei kann nicht jeder Transkriptionsfaktor jedes Gen regulieren. Für verschiedene Gene bestehen im Promotor und Enhancer kodierte Muster (Bindungsstellen), die spezifische DNA-Erkennungsmotive für die Transkriptionsfaktoren sind. Eine Regulation der Zielgene erfolgt somit durch komplexe Interaktionsmuster zwischen aktivierenden/suppressiven Transkriptionsfaktoren (Goodrich et al., 1996)

1.4.2 NF- κ B

NF- κ B wurde 1986 in B-Lymphozyten der Maus entdeckt (Sen et al., 1986) und als ein Transkriptionsfaktor mit hoher konstitutiver Aktivität an einem spezifischen Sequenzmotiv im Immunglobulin-kappa-Ketten-Enhancer beschrieben. Nach seiner Entdeckung zeigte sich relativ früh, dass NF- κ B in fast allen Körperzellen vorkommt und durch verschiedene Stimuli sehr schnell zahlreiche Gene aktivieren kann. Somit stellt NF- κ B einen pluripotenten Aktivierungsfaktor einer zellulären Antwort auf Veränderungen in der Umwelt dar. NF- κ B hat eine zentrale Rolle im Immunsystem und bei inflammatorischen Prozessen und ist zudem an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Zelladhäsion, Wachstumskontrolle, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Baldwin, 1996; Siebenlist, 1997; Karin et al., 2000). Es gibt eine große Anzahl von Stimuli die NF- κ B aktivieren können. Aktivierende Stimuli sind infektiöse Agenzien wie Viren und Bakterien, physikalischer Stress wie UV-Strahlung bis hin zu biochemischen Reizen und zellulären Botenstoffen wie die Zytokine (TNF- α und IL-1), Hormone oder Wachstumsfaktoren (siehe Tabelle 1). NF- κ B regulierte Gene sind zum größten Teil Gene, die Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und zelluläre Rezeptoren kodieren (siehe Tabelle 2).

Tabelle1: Auflistung einiger NF-κB aktivierenden Agenzien

NF-κB aktivierende Agenzien

Zytokine	TNF-α /TNF-β (Tumornekrosefaktor) IFN-β/IFN-γ (Interferon) IL-1/IL-2/IL-6/IL-17/IL-18 (Interleukin)
Wachstumsfaktoren	GM-CSF (Granulocyte/Macrophage colony stimulating factor) Insulin
Physikalischer Stress	UV-Strahlung Ionisierende Strahlung
Oxidativer Stress	H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid) Reoxigenierung Ozon
Bakterielle Produkte	Lipopolysaccharide
Viren	HIV-1 (Human immunodeficiency virus) HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus) HBV (Hepatitis B virus) HSV-1 (Herpes simplex virus) EBV (Epstein-Barr virus) CMV (Zytomegalovirus) Sendai-Virus

Tabelle2: Aufstellung einiger NFκB regulierten Gene

NF-κB regulierte Gene

Zytokine	IL-1α/IL-1β/IL-2/IL-3/IL-6/IL-12/IL-15 TNF-α/TNF-β IFN-β
Wachstumsfaktoren	G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) GM-CSF (Granulocyte/Macrophage colony stimulating factor) M-CSF (Macrophage colony stimulating factor)
Chemokine	IL-8 Makrophagen Chemotaktisches Peptid-1
Adhäsionsmoleküle	ICAM-1 (Intrazelluläres Adhäsionsmolekül) VCAM-1 (Vaskuläres Zell Adhäsionsmolekül) E-Selektin
Immunregulierende Proteine	Igk leichte Ketten MHC Klasse I und Klasse II TCR-α/TCR-β (T-Zell Rezeptor) β ₂ -Mikroglobulin
Transkriptionsfaktoren	p105/ p100/c-Rel/Bcl 3
Stress-Proteine	SAA (Serum Amyloid A precursor) Komplementfaktoren C3, C4 α ₁ -Acid-Glykoprotein

1.4.3 Die NF- κ B/Rel Transkriptionsfaktoren

Die aktive Form von NF- κ B ist ein Dimer aus zwei verwandten Protein-Untereinheiten, die aus der Rel-Familie stammen. In Säugetieren sind bisher folgende Mitglieder der NF- κ B/Rel-Familie bekannt: p65 (Rel A), Rel B, p50/p105, p52/p100 (Pahl, 1999). Die Untereinheiten besitzen eine ca. 300 Aminosäuren lange N-terminale Region, die als Rel-homology-domain (RHD) bezeichnet wird. Innerhalb dieser RHD befindet sich eine DNA-Bindestelle, die als Kernlokalisierungssignal (NLS= Nuclear localization signal) bezeichnet wird, welche für den Transport des Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern benötigt wird. Dort ist auch die Dimerisierungsregion lokalisiert (Baldwin, 1996). P50 und p52 entstehen durch Proteolyse ihrer Vorläuferproteine p105 und p100, die eine lange carboxyterminale Domäne mit sieben Wiederholungen von Aminosäuresequenzen (Ankyrin-Repeats) besitzen. Diese Ankyrin-Repeats maskieren das NLS, was zu einer Inhibition der Translokation von NF- κ B in den Zellkern und Zurückhaltung im Zytoplasma führt. Mit der proteolytischen Abspaltung des Ankyrin-Repeats durch das 26S-Proteasom wird der p50 bzw. p52 Teil des Vorläuferproteins frei und steht der Dimer-Bildung zur Verfügung. (Henkel et al., 1992; Palombella et al., 1994). Von großer Bedeutung ist, dass die Proteine der NF- κ B/Rel-Familie miteinander viele verschiedene Homo- und Heterodimer-Kombinationen ausbilden können. Dadurch können verschiedene Untereinheiten-Kombinationen unterschiedliche DNA-Erkennungsmotive detektieren und somit verschiedene Gene aktivieren. Zusätzlich haben die Untereinheiten-Kombinationen zu verschiedenen NF- κ B-Bindungsstellen eine starke oder schwache Affinität, was zu einer zusätzlichen regulatorischen Varianz führt (Perkins et al., 1992). Die DNA-Konsensussequenz der DNA-Erkennungsmotive für NF- κ B ist RYN (R=Purin, Y=Pyrimidin, N=beliebige Base).

1.4.4 I κ B (Inhibitor von NF- κ B)

Die Inaktivierung von NF- κ B im Zytoplasma wird durch die Bindung an inhibitorische Untereinheiten (I κ B) bewirkt. Es wurden bisher sieben I κ B-Untereinheiten beschrieben: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ und BCL₃ sowie die

Vorläuferproteine p100 und p105. Alle I κ B-Untereinheiten besitzen, wie bei p100/p105 bereits erwähnt, eine Domäne mit Ankyrin-Repeats. Die I κ B-Proteine maskieren durch ihre Ankyrin-Repeats das NLS und halten den Transkriptionsfaktor inaktiv. Am bekanntesten und am ausführlichsten beschrieben ist I κ B α (Ghosh et al., 1990; Zabel et al., 1990; Davis et al., 1991; Haskill et al., 1991). I κ B α besteht aus einer 70 Aminosäuren langen N-terminalen Region mit potentiellen Phosphorylierungsstellen, einer 205 Aminosäuren langen zentralen Region, in der die Ankyrin-Repeats liegen, sowie einer 42 Aminosäuren langen C-terminalen **PEST**-Domäne. Die **PEST**-Region ist eine **P**rolin, **G**lutamin, **S**erin und **T**hreonin reiche Sequenz. Sie ist für den schnellen Abbau der Proteine durch Proteasomen verantwortlich (Rechsteiner et al., 1996). Die sehr schnelle Aktivierung von NF- κ B durch eine Stimulanz beruht auf der schnellen Degradierung des Inhibitormoleküls I κ B α durch Phosphorylierung an spezifischen Serinresten und die darauf folgende Ubiquitinierung (Traenckner et al., 1995; Baldi et al., 1996) und proteolyse durch das 26S-Proteasom (Chen et al., 1995). NF- κ B wiederum bindet nach seiner Aktivierung auch an NF- κ B-Bindestellen im Promotor von I κ B α und fördert die Resynthese des I κ B α -Proteins (Le Bail et al., 1993). Im Zellkern bindet I κ B α aufgrund der hohen Bindungsaffinität zu NF- κ B an den Transkriptionsfaktor und entfernt diesen von der DNA durch Bildung eines neuen I κ B α /NF- κ B-Komplexes, der dadurch wieder zurück ins Zytoplasma gelangt (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Dies stellt einen autoregulatorischen transkriptionellen Rückkopplungsmechanismus dar (Sun et al., 1993).

1.4.5 IKK (Inhibitor κ B-Kinasekomplex)

Zwei Komponenten des I κ B-Kinasekomplexes sind die Serin/Threonin-Kinasen IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2) (Mercurio et al., 1997; Zandi et al., 1997). IKK α (85 kDa) und IKK β (87 kDa) besitzen eine N-terminale Kinasedomäne, eine Leucin-Zipper Region, mit der sie miteinander Homo- und Heterodimere ausbilden können, sowie eine Helix-Loop-Helix-Domäne (HLH) in ihrem C-terminalen Bereich mit der sie weitere Proteine binden können. Eines dieser Proteine, mit denen IKK α und IKK β dimerisieren und den

I κ B-Komplex bilden, ist das 48 kDa große Protein Nemo (NF- κ B essential modulator), welches auch als IKK γ bezeichnet wird (Rothwarf et al., 1998; Yamaoka et al., 1998). Auch IKK wird wie die I κ B-Proteine durch Phosphorylierung reguliert (Delhase et al., 1999). Nach einem NF- κ B aktivierenden Stimulus werden in den Kinasedomänen von IKK bei IKK α die Serinreste 176 und 180 und bei IKK β 177 und 181 phosphoryliert. Dies aktiviert den IKK-Komplex, wobei nur die Phosphorylierung von IKK β notwendig ist. Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert wiederum die I κ B-Proteine. Es wurden viele Kinasen gefunden, die für die Aktivierung (Phosphorylierung) von IKK verantwortlich sein können. Ein Beispiel eines Aktivators von IKK ist NIK (NF- κ B-inducing-kinase) (Regnier et al., 1997; Woronicz et al., 1997), der unter anderem nach TNF-Stimulation durch die beiden TNF-Rezeptoren TNFR $_1$ und TNFR $_2$ aktiviert werden kann. Weitere aktivierende Kinasen sind NAK (NF- κ B-inducing-kinase) (Tojima et al., 2000) und die Ubiquitin-abhängige Kinase TAK1 (Wang et al., 2001).

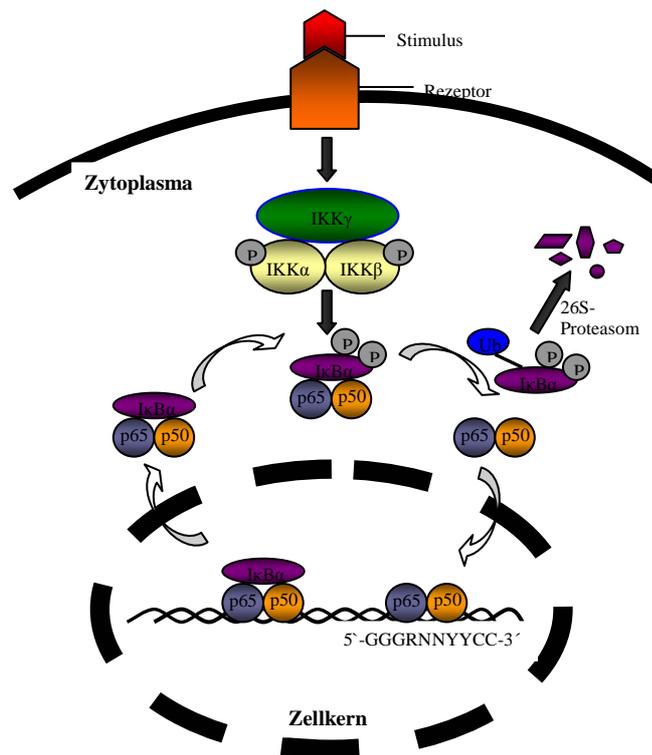


Abbildung 1.1: Allgemeine Darstellung des NF- κ B Signaltransduktionsweges.

Gezeigt wird das Beispiel eines p65(RelA)/p50-Heterodimers im Komplex mit I κ B α . Durch einen Stimulus wird der IKK-Komplex phosphoryliert und damit aktiviert. Dieser phosphoryliert I κ B α , was als Signal für eine nachfolgende Polyubiquitinierung von I κ B α dient. Das polyubiquitinierte I κ B α wird durch das 26S-Proteasom degradiert, wodurch NF- κ B freigesetzt wird. NF- κ B transloziert in den Zellkern, wo es an das κ B-Erkennungsmotiv in den Promotoren seiner Zielgene bindet und diese reguliert (eigene Darstellung).

1.4.6 NF- κ B und Tumorentstehung

Der NF- κ B Signaltransduktionsweg spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsvorgängen und der Immunantwort, sondern auch bei der Zell-Proliferation und Onkogenese (Baldwin, 1996; Mayo et al., 1997). NF- κ B besitzt die Fähigkeit die Apoptose zu unterdrücken und die Expression von Protoonkogenen wie c-myc und cyclin D1 zu induzieren (Gutridge et al., 1999; Phal, 1999). Ebenso ist NF- κ B in der Lage die Expression von z.B. Zelladhäsions-Proteinen, Matrix Metalloproteinasen, Chemokinen und inflammatorischen Zytokinen zu regulieren, die eine Tumordinfiltration und Angiogenese fördern (Bharti et al., 2002). Die ersten Hinweise für die Bedeutung von NF- κ B in der Tumorgenese fand man durch das stark onkogene retrovirale Homolog von c-Rel. Das Homolog v-Rel ist die Ursache bei der Karzinogenese in lymphatischen Vogelzellen (Gilmore et al., 1996). Eine spätere Studie wies darauf hin, dass v-Rel auch *in vivo* die Fähigkeit hat maligne Zellen zu induzieren. Transgene Mäuse, die v-Rel unter der Kontrolle eines T-Zell-spezifischen Promotors exprimieren, entwickeln T-Zell-Lymphome. Inhibiert man die NF- κ B Aktivität in diesen Tieren, verzögert sich die Entwicklung von T-Zell Lymphomen und die Lebensdauer von v-Rel transgenen Mäusen wird verlängert. Es wurde anhand vieler humaner Tumorerkrankungen (z.B. Brustkrebs, Lungenkrebs und viral-induzierter Tumore) festgestellt, dass eine Hemmung von NF- κ B eine Aufhebung der Proliferation von Tumorzellen bewirkt (Giri et al., 1998; Chen et al., 2001; Mukophadhyay, 2001; Rath et al., 2001; Bharti et al., 2002; Bharti et al., 2003; Younes et al., 2003). Einen weiteren Hinweis für die Rolle von NF- κ B in der Onkogenese liefert die Schädigung der Gene der NF- κ B Familie. Es wurde gezeigt, dass Gene, die z.B. Rel-A, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) und NF- κ B2 (p100/p52) Proteine kodieren, in Regionen des Genoms lokalisiert sind, die an der Umgestaltung und Verstärkung von Tumoren beteiligt sind (Rayet et al., 1999; Chen et al., 2001). In einigen Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass die Gene von NF- κ B2 und c-Rel mutiert waren (Neri et al., 1991; Fracchiolla et al., 1993). Die Hemmung der NF- κ B-Aktivität in epidermalen Keratinozyten führt zur spontanen Bildung von epidermalen Tumoren (Seitz et al., 1998; Dajee et al., 2003). Hogerlinden et. al haben dies 1999 speziell in

der Haut von adulten Mäusen gezeigt. Die Hemmung von NF- κ B erfolgt mit einem hautspezifischen K5-I κ B- α Superrepressor. Die Tiere zeigen neben einer gestörten epidermalen Homeöostase und Haarfollikel-Entwicklung eine Zunahme der Anzahl apoptotischer Keratinozyten und die spontane Bildung von Plattenepithelkarzinomen. Einen weiteren Hinweis liefern IKK γ -defiziente Mäuse. Weibliche heterozygote IKK γ -defiziente Mäuse entwickeln einen Hautphänotyp, dessen Verlauf große Ähnlichkeiten mit der humanen Hauterkrankung Incontinentia Pigmenti hat (Makris et al., 2000; Schmidt-Supprian et al., 2000). Es ist nachgewiesen worden, dass Incontinentia Pigmenti das Resultat eines Funktionsverlustes von IKK γ durch eine Mutation in diesem Gen ist (Smahi et al., 2000). Im Zusammenhang mit Plattenepithelkarzinomen wurde beschrieben, dass die Tumore eine späte Manifestation von Incontinentia Pigmenti darstellen (Simmons et al., 1986; Korstanje et al., 1991; Sakai et al., 2000). Interessant für die Tumorentstehung durch NF- κ B in der Haut ist das proinflammatorische Zytokin TNF- α . In drei verschiedenen Mausmodellen (K5-I κ B- α , weibliche heterozygote IKK γ -defiziente und K14-Cre/IKK2^{FL/FL}- Mäuse) wurde eine vermehrte Expression von TNF in der Haut gefunden (van Hogerlinden et al., 1999; Makris et al., 2000; Pasparakis et al., 2002). Die Kreuzung von K5-I κ B- α Mäusen in einen Tumor necrosis factor receptor 1 (Tnfr-1) negativen Hintergrund unterdrückt die Entwicklung des Phänotyps und die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen.

1.5 Gen-Knock-out

Durch das zielgerichtete Ausschalten von Genen in der Maus hat man die Möglichkeit, die Funktionen eines Gens *in vivo* zu erforschen. Knock-out-Mäuse sind vor allem als Modellsystem zur Analyse menschlicher Erbkrankheiten geeignet. Um einen Knock-out bei Mäusen zu generieren, müssen als erstes mutierte Allele in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) übertragen werden (Soriano, 1995). Das mutierte Allel des zu untersuchenden Gens wird über einen Targeting-Vektor, der einen homologen Sequenzabschnitt zum Zielgen hat, durch Transfektion in die ES-Zellen übertragen. Durch homologe Rekombination integriert das mutierte Allel an

dem vorgesehenen Gen-Locus. Die Frequenz einer homologen Rekombination beträgt ca. 1 %. Durch Insertion eines Selektionsmarkers, wie z.B. des neo^r -Gens (Neomycin-Resistenz), in den zum Zielgen homologen Sequenzabschnitt, überleben nach Behandlung mit Neomycin die rekombinanten Zellen aufgrund ihrer erworbenen Neomycin-Resistenz (positive Selektion) und können von den nichtrekombinierten Zellen getrennt werden. Außerhalb des homologen Bereichs kann man einen zweiten Selektionsmarker, wie z.B. das Thymidin-Kinase-Gen des Herpes-simplex-Virus, einfügen. Im Gegensatz zum endogenen Enzym der Maus kann die virale Thymidin-Kinase das Nucleotidanalogen Ganciclovir in das Monophosphat überführen, das nach Bildung des Triphosphats die DNA-Replikation in den ES-Zellen hemmt. Behandelt man die Zellen mit Ganciclovir, sterben die Rekombinanten mit zufällig eingeführter DNA (negative Selektion), weil in ihrer Sequenz das virale Thymidin-Kinase-Gen noch enthalten ist. Bei einer homologen Rekombination ist dieser Abschnitt nicht mehr vorhanden und man erhält die Rekombinanten mit Locus-spezifisch eingefügter DNA. Diese ES-Zellen werden in die Höhle der Blastocyste eines Embryos übertragen. Die Embryonen werden in ein pseudoträchtiges Weibchen implantiert. Einige dieser Nachkommen sind Chimäre. Diese Nachkommen besitzen Gewebe, die sowohl aus den Wirtszellen, als auch aus den injizierten ES-Zellen entstanden sind. Da sich aus den ES-Zellen sowohl Gewebe der Keimbahn als auch somatische Zellen entwickeln können werden die Chimäre mit Wild-Typ-Mäusen gekreuzt. Ein Teil der Nachkommen besitzt Keimbahnzellen, die aus den ES-Zellen entstanden sind. Kreuzt man die für das mutierte Allel heterozygoten Tiere, erhält man Nachkommen, die für das Allel homozygot sind und somit eine Knock-out-Mutation in sich tragen.

1.5.1 Das Cre-loxP-Rekombinationssystem

Häufig führt der Knock-out eines Gens sehr früh zu einem letalen Phänotyp. Außerdem ergibt sich oft die Fragestellung, wie sich der Knock-out eines Gens in bestimmten Körperbereichen und/oder bestimmten Entwicklungsphasen der Maus verhält. Um dies beantworten zu können, wurde das

Cre-loxP-Rekombinationssystem entwickelt, das einen Organ- und/oder Zeitspezifischen Knock-out erlaubt (Gu et al., 1994).

Das Cre-loxP-Rekombinationssystem stammt aus dem Bakteriophagen P1. Das Verfahren beruht auf positionsspezifischen DNA-Rekombinasestellen (loxP-Stellen: locus of crossover in P1) und dem Enzym Cre (causes recombination), das die Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen katalysiert (Sternberg et al., 1981; Abremski et al., 1984)

Dieses System kann auch auf Mauszellen übertragen werden. In den ES-Zellen wird das untersuchte Gen durch homologe Rekombination mit loxP-Sequenzen flankiert. Die außerhalb des Zielgens liegenden loxP-Stellen beeinträchtigen die Genfunktion nicht und lassen weiterhin eine Genexpression zu. Wird die Maus mit einer transgenen Mauslinie für die Cre-Rekombinase gekreuzt, kommt es zu einer Deletion des Zielgens durch eine Exzision zwischen den loxP-Sequenzen. Dies führt zu einem vollständigen Funktionsverlust des Zielgens. Um die zelltypspezifische Inaktivierung des Zielgens zu erreichen, ist ein zelltypspezifischer Promotor vor die Cre-Rekombinase geschaltet. So kommt es nur in den spezifischen Zellen zu einem Knock-out, weil nur dort die Cre-Rekombinase exprimiert wird.

Um die Cre-Rekombinase in einem bestimmten Entwicklungsstadium der Maus zu aktivieren, werden Konstrukte verwendet, die z.B. durch das Injizieren eines Hormon-Analogons, zum gewünschten Zeitpunkt die Expression induzieren.

1.5.2 Epidermis-spezifische Deletion von IKK2

IKK2-defiziente Mäuse sterben in der Gebärmutter durch TNF induzierte Apoptose (Li et al., 1999; 1999; Tanaka et al., 1999;). Um die Funktion von IKK2 in der Epidermis zu untersuchen, wurde das Cre-loxP-Rekombinationssystem verwendet. Es wurden Mäuse generiert, deren IKK2 Allele von loxP-Sequenzen (IKK2^{FL/FL}) flankiert wurden (Pasparakis et al., 2002). Um einen epidermisspezifischen IKK2-Knock-out zu erzeugen, wurden die IKK2^{FL/FL} Tiere mit einer transgenen Mauslinie gekreuzt, die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines humanen Keratin 14 (K14) Promotors exprimiert (Hafner et al., 2004). Der Keratin 14 Promotor ist im

Stratum basale der Epidermis aktiv (Vassar et al., 1989). Nachkommen mit einer IKK2 Deletion in der Epidermis (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}) weisen direkt nach ihrer Geburt weder makroskopisch noch mikroskopisch Veränderungen in der Haut auf. Vier bis fünf Tage nach ihrer Geburt (postnatal P4-P5) beginnt die Haut der Neugeborenen hart und unflexibel zu werden. Die Haut wird steif, dick, entzündlich und zeigt eine starke Schuppung. Zwischen P9 und P11 sterben die Tiere aus bisher ungeklärtem Grund. Histologisch zeigt die Haut der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Tiere viele Merkmale einer Psoriasis. Die Tiere leiden an einer verdickten Epidermis und dem Verlust des Stratum granulosum. Außerdem haben die Tiere eine verdickte Hornschicht und zeigen stellenweise Parakeratose. Unter dem Stratum corneum bilden sich Pusteln. In der Dermis ist die Zelldichte stark erhöht und die Gefäße sind erheblich erweitert. Immunhistologisch zeigt sich ab P3, dass das Fehlen von IKK2 eine Hochregulation von Keratin 6 bewirkt. Keratin 6 ist ein Marker für eine entzündete und hyperproliferierende Epidermis und wird unter anderem durch den Prozess der Wundheilung ausgelöst (Mansbridge et al., 1987; Mommers et al., 2000). Es ist ebenfalls eine suprabasale Expression von K14 erkennbar, die normalerweise nur auf das Stratum basale beschränkt ist. Dagegen ist die Expression des suprabasalen Keratins 10 stark herunterreguliert. Die terminalen Differenzierungsmarker der Keratinozyten, Loricrin und Filaggrin fehlen fast vollständig. Die K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse weisen somit eine gestörte Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten *in vivo* auf. *In vitro*-Untersuchungen an isolierten epidermalen Keratinozyten zeigten allerdings keinen zellautonomen Effekt der IKK2-Deletion auf die Expression von Keratin 10, Loricrin und Filaggrin.

Eine weitere Auffälligkeit von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen ist eine erhöhte Anzahl von Makrophagen, Granulozyten und CD4-positiven T-Zellen. Die vorherrschende Meinung ist, dass entzündliche Erkrankungen wie Psoriasis durch T-Zellen vermittelt werden. Deshalb wurde die Rolle der T-Zellen näher untersucht. Um herauszufinden, inwieweit $\alpha\beta$ T-Lymphozyten an der Entwicklung des Phänotyps beteiligt sind, wurden die K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit T-Zell Antigen Rezeptor- α (TCR α) Knock-out Mäusen verpaart. Die K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/TCR α ^{-/-} Tiere entwickeln den selben Phänotyp wie K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse, zeigen den gleichen Verlauf der Krankheit, sowie die

gleichen histologischen und immunohistologischen Auffälligkeiten. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die $\alpha\beta$ T-Lymphozyten eine Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf des Phänotyps spielen. Um zu erforschen, welche Bedeutung TNF in der Pathogenese der Hauterkrankung hat, wurden K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit TNF-Rezeptor I (TNFR1)-defizienten Mäusen (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/Tnfr1^{-/-}) verpaart. K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/Tnfr1^{-/-} Mäuse entwickeln den Phänotyp der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse nicht. Histologische und immunohistologische Untersuchungen zeigen keine Unterschiede zur Haut von Wildtypmäusen. Es kann keine Beeinträchtigung der Differenzierung und Proliferation bei Keratinozyten beobachtet werden. Bei diesen Tieren kommt es zu keiner Erhöhung der Entzündungszellen in der Dermis. Das beweist, dass TNF ein wichtiger Faktor bei der Entstehung des Phänotyps in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen ist (Pasparakis et al., 2002). Vor allem Makrophagen, die massiv in die Dermis der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse einwandern, sind als Hauptproduzenten von TNF bekannt.

1.6 Clodronat-Liposomen

Um die Makrophagen in der Haut der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse zu depletieren, wurden in dieser Arbeit Clodronat-Liposomen benutzt. Clodronat (Cl2MBP, Dichlormethylen-disphosphonat) gehört zur Familie der Bisphosphonate. Bisphosphonate sind Analoga des physiologisch vorkommenden Pyrophosphats. Bisphosphonate sind eine Gruppe osteotroper Medikamente, die für diagnostische und therapeutische Zwecke bei Knochen- und Kalziumstoffwechselkrankheiten entwickelt wurden. Das freie hydrophile, negativ geladene Clodronat ist kaum zellmembrangängig und wird im Blut extrem schnell abgebaut (Fleisch, 1988). Um Clodronat in den Makrophagen anzureichern, wird es liposomal verkapselt (Clodronat-Liposomen). Die mit Clodronat angereicherten Liposomen werden von Makrophagen phagozytiert. In den Makrophagen wird Clodronat durch lysosomale Enzyme aus den Liposomen freigesetzt (Van Rooijen et al., 1994). Der Wirkmechanismus des Clodronats ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Das Clodronat wird in den Makrophagen zu einem nicht metabolisierbarem ATP-Analogen Adenosin-5`-(β -dichlormethylen)-Triphosphat (AppCCl₂p) metabolisiert (Frith et al., 2001).

Durch AppCCl₂p wird an der inneren mitochondrialen Membran die ADP/ATP-Translokase inhibiert. Dies führt zum Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials und die Zellen gehen in Apoptose (Lehenkari et al., 2002). Rogers et al., 2000 beschreibt, dass durch das nichtmetabolisierbare ATP-Analogon die energieabhängige Farnesyl- und Geranylsynthese gehemmt wird und dadurch indirekt die Funktion der GTPasen. Die Hemmung von GTPasen wie Rab (Regulation der Exozytose und Endozytose), Rho und Ras (unter anderem Regulation beim Aufbau des Zytoskeletts und der Zellmigration) führt zur Apoptose der Zelle.

1.7 DNA-Microarray Chip-Analyse

Mit der DNA-Microarray Chip-Analyse kann das Gesamtbild der Genexpression in Zellen oder Geweben untersucht werden. Dabei wird die Expression der RNA erfasst. Auf der Chipoberfläche sind genspezifische Oligonukleotide synthetisiert worden, die die meisten Gene eines Organismus abdecken. Die isolierte RNA der Zellen oder des Gewebes wird in cDNA umgeschrieben. Dabei wird ein Bakteriophagen-T7-Promotor benutzt, den die synthetisierten cDNA Stränge tragen. Die T7-RNA-Polymerase transkribiert die cDNA-Stränge mit vorgeschaltetem T7-Promotor in biotinylierte cRNA. Durch eine metallische Hydrolyse wird die biotinylierte cRNA in 35-200 Nukleotide große Fragmente geschnitten. Diese werden auf den Genchip aufgetragen, auf dem sie mit den entsprechenden synthetisierten Oligonukleotiden hybridisieren. Nach einer gewissen Inkubationszeit werden die Chips mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex gefärbt. Durch den anschließenden Laser-Scan wird detektiert, ob und wie stark ein Gen exprimiert wurde. Diese Expressionsmuster können mit einem Computeranalyseprogramm untereinander verglichen werden. In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster von Kontrollmäusen mit dem Expressionsmuster der IKK2-defizienten Mäuse verglichen. Über den „change fold“ lässt sich berechnen, welche Gene in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen gegenüber den Kontrollen hoch- oder runterreguliert wurden (<http://www.affymetrix.com/index.affx>).

1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung von pathogenetischen Mechanismen der Psoriasis-ähnlichen entzündlichen Hautkrankheit nach epidermisspezifischer Deletion von IKK2. Dadurch sollten weitere Erkenntnisse über die Ursachen und den Verlauf entzündlicher Hautkrankheiten, insbesondere Psoriasis, gewonnen werden.

Mäuse mit epidermisspezifischer Deletion von IKK2 sterben nach ca. 9-11 Tagen und erlauben daher keine langfristigen mechanistischen Untersuchungen. In den ersten Tagen nach der Geburt durchläuft die Epidermis der Maus eine Anpassungsreaktion und es blieb bisher unklar, ob die entzündlichen Veränderungen in Mäusen mit Epidermis spezifischer Deletion von IKK2 im Zusammenhang mit einer solchen Anpassungsreaktion zu sehen sind oder ob es sich um eine grundlegende Störung der Homöostase der Haut handelt. Um zu erforschen, ob und wie sich die Deletion von IKK2 in der Epidermis beim adulten Tier auswirkt, sollten die Konsequenzen der epidermisspezifischen Deletion von IKK2 in einem induzierbaren System untersucht werden. Dazu wurden Tiere mit geflochtenen IKK2-Allelen und einem Tamoxifen induzierbaren Cre-Rekombinase-System gezüchtet, die eine zeitlich und räumlich definierte Ablation von IKK2 in der murinen Epidermis ermöglichten.

Weiterhin sollte untersucht werden, welche der in die Haut einwandernden Entzündungszellpopulationen eine essenzielle Bedeutung für die Entwicklung des Hautphänotyps hat und ob eine funktionelle Hierarchie innerhalb des Entzündungsinfiltrates vorliegt. Dazu wurden gezielt einzelne Immunzellpopulationen aus der Haut eliminiert und die Wirkungen bestimmter pro-inflammatorischer Zytokine neutralisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien und Materialien stammten, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Biozym (Oldendorf), Roche (Mannheim), Life Technologies (Karlsruhe), Biorad (München), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Peclab Biotechnologie (Erlangen) sowie Amersham Pharmacia (Freiburg). Alle Chemikalien wiesen mindestens die Reinheitsstufe „p.a.“ auf.

2.1.2 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

ABC-Lösung	PBS, 0,1 % (w/v) CaCl ₂ , 0,1 % (w/v) MgCl ₂
DNA-Probenpuffer (6x)	10 % (v/v) TAE, 50 % Glycerin, 60 mM EDTA; pH 7,0
DNA- Lysispuffer	200 mM NaCl, 0.2 % (w/v) SDS, 5 mM EDTA; pH 8,0, 100 mM Tris, pH 8,5
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 8,4 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
RIPA ⁺	5 mM EDTA, 1% Titron X-100, 1%NP40, 0,1% SDS, 0,5% Deoxycholate, 20 µM Leupeptin, 1 mM Phenylmethyl fluoride, 20 µM Soybean-trypsin- inhibitor, 0,5 mM NaVO ₃ , 10 mg/ml p- Nitrophenylphosphat
TAE	40 mM Tris, 2 mM EDTA; pH 8,0
TBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl; pH 7,6
TE-Puffer	0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 7,6
Trypsin/EDTA	0,1 % (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA

2.1.3 Kits und weitere Materialien

RNAeasy mini Kit (250)	Qiagen, Hilden
BCA Protein Assay	Pierce Rockford, IL, USA
DAKO Pen	DAKO, Hamburg
Tissue-Tek O.C.T.	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Gene Ruler 1 kB-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PCR Puffer 10x	NEB, Frankfurt
Affymetrix Murine Genome U74Av2 arrays	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
GeneChip test 3 arrays	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA

2.1.4 Enzyme

Proteinase K	SIGMA-ALDRICH Chemie, Taufkirchen
Taq Polymerase	NEB, Frankfurt
Trypsin	Biochrom, Berlin

2.1.5 Antikörper

Die Primärantikörper waren entweder unkonjugiert oder mit Biotin gekoppelt.

<u>Primärantikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Quelle</u>
anti-Maus-Filaggrin	Kaninchen	BABCO, Richmond, USA
anti-Maus-Loricrin	Kaninchen	BABCO, Richmond, USA
anti-Maus-Keratin 6	Kaninchen	BABCO, Richmond, USA
anti-Maus-Keratin 10	Kaninchen	BABCO, Richmond, USA
anti-Maus-Keratin 14	Kaninchen	BABCO, Richmond, USA
anti-Maus-CD3	Ratte	Chemicon, Temecula, CA
anti-Maus-Gr-1 (Ly-6G)	Ratte	BD Biosciences Pharmingen, San Jose
anti-Maus-F4/80	Ratte	Serotec, Oxford, UK
anti-Maus-Ki-67 (TEC-3)	Ratte	Dako, Glostrup, Dänemark
anti-Maus-CAAT (CDP)	Kaninchen	Meinrad Busslinger, Wien, Österreich

anti-Mouse-Laminin 5	Kaninchen	Manuel Koch, Köln, Deutschland
anti-Maus-pSTAT3	Kaninchen	Cell Signaling, Biolabs Beverly, MA
anti-Maus-pERK1/2	Kaninchen	Cell Signaling Biolabs, Beverly, MA
anti-human-huTNFR:Fc chimäres Molekül	Human	J. Peschon, Amgen, Seattle, Washington, USA
anti-Maus-CD83	Ratte	NatuTec, Frankfurt am Main, Deutschland
anti-Maus-CD80	Hamster	NatuTec, Frankfurt am Main, Deutschland
anti-Maus-CD206	Ratte	NatuTec, Frankfurt am Main, Deutschland
anti-Maus-CD16/32	Ratte	NatuTec, Frankfurt am Main, Deutschland
anti-Maus-CD14	Ratte	NatuTec, Frankfurt am, Main, Deutschland
anti-Maus-CD11b	Ratte	NatuTec, Frankfurt am Main, Deutschland

<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Quelle</u>
Alexa Fluor 488- Streptavidin gekoppelt	/	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IgG (H+L), anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
IgG (H+L), anti-Ratte Alexa 488	Ziege	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
IgG (H+L), anti-Hamster Alexa 488	Ziege	Molecular Probes, Eugene, OR USA

Spezifischer Antikörper gegen phosphoryliertes ERK1/2 / Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

2.2 Methoden

2.2.1 Mausezucht

Für die Mausexperimente wurden Mäuse mit loxP site geflochten IKK2 Allelen benutzt, die die Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines K14 Promotors (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}) exprimierten (Pasparakis et al., 2002). Die Mäuse wurden mindestens fünf Generationen in den C57BL/6 genetischen Hintergrund gezüchtet. Alle Tiere entwickelten ab Tag vier eine schnell verlaufende inflammatorische Hauterkrankung (Pasparakis et al., 2002). Als Kontrolle wurden Mäuse benutzt, die Cre exprimierten aber kein oder nur ein IKK2 Allel besaßen, sowie Mäuse, die keins, eins oder zwei IKK2 Allele besaßen, aber keine Cre Rekombinase exprimierten. Diese Mäuse zeigten eine normale Haut (Pasparakis et al., 2002). Mäuse mit geflochten IKK2 Allelen wurden mit Mäusen verpaart, die K14-Cre exprimierten und einen CD18 oder IFN- γ negativen Rezeptor (Huang et al., 1993; Scharffetter-Kochanek et al., 1998) hatten um Tiere mit einer epidermis-spezifischen Deletion von IKK2 und einer Deletion von CD18 (CD18^{-/-} K14-Cre/IKK2^{FL/FL}) oder IFN- γ (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/IFN- γ R^{-/-}) zu züchten. Die IFN- γ Rezeptor negativen Mäuse wurden von „The Jackson Laboratory“ erworben (strain B6.129S7-Ilfng1tm1Agt/J). Mäuse mit einer Tamoxifen-induzierten, epidermis-spezifischen Deletion von IKK2 (K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL}) wurden durch die Verpaarung von Mäusen mit geflochten IKK2 Allelen (IKK2^{FL/FL}) und Mäusen, die eine Cre-Rekombinase mit humanem Estrogen Rezeptor unter der Kontrolle eines Keratin 14 Promoter (K14-Cre-ER^{T2}) (Indra et al. 2000) exprimieren, generiert. Zur Zucht wurde jeweils ein Männchen mit einem oder zwei Weibchen verpaart. Nachkommen wurden 21 Tage nach der Geburt abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Nach weiteren drei Wochen erreichten die Jungtiere ihre Geschlechtsreife und konnten ihrerseits zur Zucht eingesetzt werden. Um Mäuse individuell identifizieren zu können, wurden sie

durch das Stanzen von Ohrlöchern oder nummerierten Ohrmarken markiert. Alle Mäuse wurden unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen gehalten und im Alter von 1-8 Tagen bzw. ab einem Alter von sechs Wochen für Experimente eingesetzt. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

2.2.2 Isolation der Epidermis aus der Maushaut

Die Epidermis wurde von der Dermis mit einer Pinzette abgezogen, nachdem die Haut in einer Lösung mit 3,8 % NH_4SCN (Ammoniumrhodanid) in 0,1 M NaKHPO_4 -Puffer 1 h bei 4 °C inkubiert wurde. Die DNA wurde aus der Epidermis wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben isoliert.

2.2.3 DNA-Isolation aus Mausschwänzen

Von den zu genotypisierenden Mäusen wurde etwa 0,5-1 cm der Schwanzspitze amputiert, in ein Eppendorfgefäß mit 500 µl Lysispuffer + 10 µl Proteinase K (20 mg/ml, Peqlab, Erlangen) überführt und über Nacht unter Schütteln bei 55 °C gelöst. Nach einem erfolgreichen Verdau wurden die Lysate 5 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert um unverdaute Knochen und Haare zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein mit 500 µl Isopropanol gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde so lange über Kopf geschüttelt, bis die genomische DNA ausfällt. Das Reaktionsgefäß mit der ausgefallten DNA wurde erneut für 10 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70 % Alkohol gewaschen und 5-10 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde ins Reaktionsgefäß zum DNA-Pellet 125 µl TE-Puffer gefüllt und über Nacht bei 50 °C unter Schütteln resuspendiert.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die extrahierte genomische DNA der Schwanzbiopsien durch eine Erhöhung der Temperatur in Einzelstränge denaturiert. Zwei synthetische Oligonucleotide (Primer), die zu den 3`-Enden beider DNA-Stränge des gewünschten DNA-Abschnitts komplementär waren, lagerten sich durch die Herabsetzung der Temperatur an die genomische DNA an. Die angelagerten Oligonucleotide dienten als Primer für die Synthese des gewünschten DNA-Fragments. Durch die zyklische Wiederholung der DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und Synthese der DNA-Fragmente, wurde die gewünschte Sequenz in einer hohen Kopiezahl amplifiziert. Folglich vermehrt sich bei jedem Zyklus die gewünschte Sequenz exponentiell (2^n). Die PCR-Reaktionen wurden in T3 Thermocyclern (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

2.2.5 Genotypisierung für Cre, IKK2, CD18-Mutation und IFN- γ -Rezeptor

Cre-PCR:

Primer:

SC1-101 (sense) 5'-GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C-3'
 SC3-102 (anti-sense) 5'-CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC-3'

Master-Mix: 30 μ l

	1 x
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	3 μ l
dNTP's (25 mM)	1,25 μ l
Primer SC1-101	1 μ l
Primer SC3-102	1 μ l
Taq-Polymerase	0,5 μ l
dd H ₂ O	23,25 μ l

2 μ l DNA pro Reaktion

PCR-Programm:

94 °C	3 min	
94 °C	30 s	
61 °C	30 s	30 x
72 °C	30 s	
72 °C	3 min	
4 °C	Pause	

Zu erwartende Bande für Cre: \approx **350 bp**

IKK2-PCR**Primer:**

MP 65 (sense) 5'-GTT CAG AGG TTC AGT CCA TTA TC-3'

MP 45 (anti-sense) 5'-TAG CCT GCA AGA GAC AAT ACG-3'

MP 49 (anti-sense) 5'-TCC TCT CCT CGT CAT CCT TCG-3'

Master-Mix: 30 µl

	1 x
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	3 µl
dNTP's (25 mM)	1,25 µl
Primer MP 45	1 µl
Primer MP 49	1 µl
Primer MP 65	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
dd H ₂ O	22,25 µl

2 µl DNA pro Reaktion

PCR-Programm:

94 °C	3 min	
94 °C	30 s	
60 °C	30 s	38 x
72 °C	45 s	
72 °C	3 min	
4 °C	Pause	

Zu erwartende Banden für:

WT Allele : **436 bp**IKK2 *gefloxte* Allele: **533 bp**IKK2 *deletierte* Allele: **652 bp**CD18-PCR:**Primer:**

CD18.1 5'-AGG ACA GCA AGG GGG AGG ATT-3'

CD18.2 5'-GCC CAC ACT CAC TGC TGC TTG-3'

CD18.3 5'-CCC GGC AAC TGC TGA CTT TGT-3'

Master-Mix: 30 µl

	1 x
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	3 µl
dNTP's (25 mM)	1,25 µl
Primer CD18.1	1 µl
Primer CD18.2	1 µl
Primer CD18.3	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
dd H ₂ O	22,25 µl

2 µl DNA pro Reaktion

PCR-Program:

94 °C	5 min	
94 °C	1 min	
58 °C	1 min	30 x
72 °C	1 s	
4 °C	Pause	

Zu erwartende Banden für

WT Allele: **450 bp**

Mutierte Allele: **150 bp**

IFN- γ -PCR:**Primer:**

oIMR0013 5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3'

oIMR0014 5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'

oIMR0587 5'-CCC ATT TAG ATC CTA CAT ACG AAA CAT ACG G-3'

oIMR0588 5'-TTT CTG TCA TCA TGG AAA GGA GGG ATA CAG-3'

Master-Mix: 30 μ l

	1 x
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	3 μ l
dNTP's (25 mM)	1,25 μ l
Primer oIMR0013	1 μ l
Primer oIMR0014	1 μ l
Primer oIMR0587	1 μ l
Primer oIMR0588	1 μ l
Taq-Polymerase	0,5 μ l
dd H ₂ O	21,25 μ l

2 μ l DNA pro Reaktion

PCR-Program:

94 °C	3 min	
94 °C	20 s	
64 °C	30 s	→ 58 °C (-0,5 °C every cycle) 12 x
72 °C	35 s	
94 °C	20 s	
58 °C	30 s	25 x
72 °C	35 s	
72 °C	2 min	
10 °C	Pause	

Zu erwartende Banden für:

WT Allele: **189 bp**

IFN- γ deletierte Allele: **280 bp**

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäure-Stränge (DNA) im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt, um ihre Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Durch die Bestimmung der Fragmentgrößen der PCR-Produkte (siehe Genotypisierung für Cre, IKK2, CD18 und IFN- γ) konnte der Genotyp der Mäuse bestimmt werden. Es wurden 2 %ige Agarosegele für die Gelelektrophorese benutzt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Für die Herstellung der Agarosegele wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und auf einen Gelträger gegossen. Durch Abkühlung polymerisierte die Agarose aus und das Gel konnte für die Elektrophorese verwendet werden. Um die DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar zu machen, wurden 10 μ g Ethidiumbromid pro 100 ml Agaroselösung dazugegeben. Unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm fluoresziert das an die DNA interkalierte Ethidiumbromid und macht die Position der DNA-Bande sichtbar. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1x Ladepuffer (6x Ladepuffer, MBI Fermentas, St. Leon Roth) versetzt. Als Größenstandard wurde die Gene Ruler 1 kB-Leiter verwendet.

2.2.7 Behandlung der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit huTNFR:Fc

Um in den K14-Cre-IKK2^{FL/FL} Mäusen TNF zu neutralisieren, wurde den Tieren täglich nach ihrer Geburt bis Tag sieben 20 μ g huTNFR:Fc subkutan in die Haut injiziert. Das Fusionsprotein huTNFR:Fc setzt sich aus der extrazellulären Domäne des humanen p75 TNF Rezeptors und dem Fc-Fragment des humanen IgG zusammen und ist im klinischen Gebrauch bei der Therapie von Arthritis und Psoriasis. Das Fusionsprotein huTNFR:Fc wurde bereitgestellt von J. Peschon, Amgen, Seattle, Washington, USA.

2.2.8 Behandlung der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit Clodronat-Liposomen

Clodronat- und PBS-angereicherte Liposomen wurden wie zuvor beschrieben präpariert (van Rooijen und Sanders, 1994). Clodronat war eine Gabe von Roche Diagnostics GmbH. K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse und Kontrollmäuse blieben unbehandelt oder bekamen subkutan eine Injektion in den Nacken.

Um die Makrophagen in der Haut zu depletieren, wurden den Tieren ab P4 bis P7 täglich 100 µl Clodonat-Liposomen verabreicht. Den Kontrolltieren wurde im gleichen Zeitraum 100 µl PBS-Clodronat (Kontroll-Liposomen) injiziert.

2.2.9 Induktion der K14-Cre-ER^{T2} Expression in K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Die K14-Cre-ER^{T2} Rekombinase wurde in den K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen durch 4-hydroxy-tamoxifen (Tamoxifen) (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) aktiviert. Ab einem Alter von sechs Wochen wurde 1 mg Tamoxifen (gelöst in 0,2 ml Ethanol) pro Maus an fünf aufeinander folgenden Tagen auf die unrasierte Haut des Rückens geträufelt. IKK2^{FL/FL} Kontrollmäuse wurden auf die gleiche Weise mit Tamoxifen behandelt. Die Effekte der Tamoxifen Behandlung wurden über einen Zeitraum von fünf Wochen beobachtet.

2.2.10 Immunfluoreszenzfärbungen von Differenzierungsmarkern in der Maushaut

Die Färbung mit Differenzierungsmarkern wurde an Paraffinschnitten in einer Feuchtkammer durchgeführt. Dazu wurden die Protokolle der Antikörperhersteller mit leichten Modifizierungen verwendet. In Paraffin eingebettete Maushautschnitte wurden durch Inkubation in Xylol zunächst entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert:

- Xylol 100 % (5 min)
- Xylol 100 % (5 min)
- Isopropanol 100 % (5 min)
- EtOH (Ethanol) 96 % (5 min)
- EtOH 75 % (5 min)
- EtOH 50 % (5 min)
- Aqua bidest (kurz ausspülen)

Anschließend wurden die Schnitte mit einer Trypsinlösung für 15 min im Inkubationsschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Schnitte 2x mit PBS/ABC für je 5 min unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler gewaschen und mit 10 % Ziegenserum für 60 min bei RT blockiert. Schnitte,

die mit dem Antikörper K14 behandelt werden sollten, wurden nicht trypsiniert. Die folgenden primären Antikörper wurden in 0,2 % Fischhaut-Gelatine (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) angesetzt: polyklonaler Antikörper gegen Keratin 10 (MK10, Babco, USA) 1:1000, polyklonaler Antikörper gegen Keratin 14 (MK14; Babco, USA) 1:1000, polyklonaler Antikörper gegen Loricrin (Babco, USA) 1:2000 und polyklonaler Antikörper gegen Filagrin (BABCO, USA.) 1:1000. Die Schnitte wurden 1 h bei RT mit den primären Antikörpern inkubiert und anschließend 5 min unter leichtem Schwenken in PBS gewaschen. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege anti-Kaninchen IgG 1:500 und Propidiumiodid als Gegenfärbung (1:100) in Fischhaut-Gelatine verdünnt für 1 h bei RT. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal für 10 min unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler in PBS gewaschen und für weitere 10 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd nachfixiert. Danach wurden die Hautschnitte kurz in Aqua bidest gewaschen und mit Gelvatol eingedeckelt. Digitale Bilder der Immunfärbungen wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica DMRE2, Heidelberg) aufgenommen. Die Aufnahme der Signale für die Differenzierungsmarkerfärbung erfolgte bei 488 ± 20 nm und die Aufnahme des Signals der Zellkerne mit Propidiumiodid bei etwa 543 nm.

2.2.11 Immunfluoreszenzfärbungen der Immunzellen in der Maushaut

Die Färbung der Immunzellen in der Maushaut wurde an Cryoschnitten in einer Feuchtkammer durchgeführt. Dabei wurden die Protokolle der Antikörperhersteller mit leichten Modifizierungen verwendet. Die Cryoschnitte wurden 10 min in eiskaltem wasserfreiem Aceton bei -20 C° fixiert, getrocknet und dreimal 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 30 min in 10 % Ziegen Serum inkubiert und dann 5 min gewaschen. Die folgenden primären Antikörper wurden in 0,2 % Fischhaut-Gelatine (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) angesetzt: monoklonaler Antikörper gegen CD3 (1:1000), GR1 (1:20; Ly-6G, Klon RB6-8C5), F4/80 (1:50), CD83 (1:100), CD80 (1:50), CD206 (1:200), CD16/32 (1:100), CD14 (1:100) und CD11b (1:100), CDP (1:100) und Laminin 5 (1:500). Die Schnitte wurden ü.N. bei 4 °C mit den primären Antikörpern inkubiert und anschließend kurz in

Aqua bidest gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege-anti-Ratte (1:500) in 0,2 % Fischhaut-Gelatine (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) angesetzt, beziehungsweise Alexa Fluor 488-Streptavidin gekoppelt (1:500) in PBS angesetzt mit Propidiumiodid als Gegenfärbung (1:100) für eine 1 h bei RT. Danach wurden die Schnitte dreimal für 10 min in PBS unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler gewaschen und für 5 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd nachfixiert. Darauf wurden die Schnitte kurz mit Aqua bidest gewaschen und mit Gelvatol eingedeckelt. Die Aufnahme der Signale für die Immunzellen erfolgte bei 488 ± 20 nm und die Aufnahme des Signals der Zellkerne mit Propidiumiodid bei etwa 543 nm.

2.2.12 Färbung der Maushaut mit dem Proliferationsmarker Ki-67

Die Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (TEC-3, DAKO™) in der Maushaut wurde an Cryoschnitten in einer Feuchtkammer durchgeführt. Die Cryoschnitte wurden 10 min in eiskaltem wasserfreiem Aceton bei -20 C° fixiert, getrocknet und dreimal 5 min unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 30 min in 10 % Ziegenserum inkubiert und dann 5 min unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler in Aqua bidest gewaschen. Der Ki-67 Antikörper wurde 1:50 in 2 % FCS/PBS angesetzt. Die Schnitte wurden mit dem Ki-67 Antikörper für 45 min bei RT inkubieren. Danach wurden die Schnitte fünf mal für je 5 Min. in PBS gewaschen. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 Ziege-anti-Ratte (1:500) in NMS (Normal Maus Serum, Dianova™) (1:8 in PBS) mit Propidiumiodid als Gegenfärbung (1:100) für eine 1 h bei RT. Danach wurden die Schnitte dreimal für 5 min in PBS unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler gewaschen und für 10 min bei RT in 1 % Paraformaldehyd nachfixiert. Hiernach wurden die Schnitte kurz mit Aqua bidest gewaschen und mit Gelvatol eingedeckelt.

2.2.13 HE-Färbung (Hämatoxilin/Eosinfärbung)

Die HE-Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert und rehydriert. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaunlösung nach Mayer (Merck, Darmstadt) und das Zytoplasma mit Eosin (0,5 %ige wässrige Lösung, Thermo Shandon, Frankfurt) gefärbt. Die digitalen Aufnahmen wurden mit einem Leica DM 4000B Mikroskop gemacht. Das Mikroskop ist mit einer KY-F75U Digitalkamera gekoppelt, die das Programm Diskus 4.50 benutzt.

2.2.14 Chloracetat-Esterase-Färbung

Die Chloracetat-Esterase-Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt um neutrophile Granulozyten zu detektieren. Die Paraffinschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert und rehydriert. Die Granulozyten wurden mit einer PBS-Lösung, die 0,8 % Hexazonium und 2 % einer Lösung (90 mg Naphthol-AS-D-Chloracetat gelöst in 80 ml Dimethylsulfoxide und 10 ml Triton X-100) beinhaltet, angefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hämalaunlösung nach Mayer (Merck, Darmstadt) gegengefärbt. Für die digitalen Aufnahmen wurde das Leica DM 4000B Mikroskop benutzt. Das Mikroskop ist mit einer KY-F75U Digitalkamera gekoppelt, die das Programm Diskus 4.50 verwendet.

2.2.15 Färbung von pERK und pSTAT3 in Maushaut

Cryoschnitte von der Maushaut wurden 15 min in 4 % Paraformaldehyd und 2 % Eisessig in PBS fixiert. Danach wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen und 2 min in 5 % Eisessig in Methanol bei 0 °C permeabilisiert. Nachfolgend wurden die Schnitte für 5 min unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler mit PBS gewaschen und anschließend 30 min in 8 % BSA/PBS bei RT blockiert. Die primären Phospho-spezifischen monoklonalen Antikörper anti-pERK1/2 (1:100) und anti-pSTAT3 (1:100) wurden in „Antibody Diluent Solution Background Reducing Agent“ (ADSBRA, Dako, Hamburg) gelöst. Die Schnitte wurden mit den Antikörpern bei 4 °C ü.N. inkubiert. Darauf wurden die Schnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen und 45 min mit Alexa 488 Ziege-gegen Kaninchen 1:500 in ADSBRA-Lösung bei RT inkubiert. Darauf

folgend wurden die Schnitte dreimal 5 min unter leichtem Schwenken auf den Schüttler mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger mit Gelvatol eingedeckelt. Die Aufnahme der Signale für pERK1/2 und pSTAT3 erfolgte bei 488 ± 20 nm.

2.2.16 Blutausstrich und Auswertung der weißen Blutkörper

Zur Bestimmung der weißen Blutkörperchen im Blut wurde von sieben Tage alten K14-Cre-IKK2^{FL/FL} Mäusen und Kontrollmäusen ein Blutausstrich vorgenommen. Die zuvor betäubten Tiere wurden decapitiert und ein Tropfen Blut aus dem Rumpf der Tiere wurde auf einen Objektträger überführt. Die an den Rand aufgebrauchten Blutropfen wurde gleichmäßig mit der Kante eines zweiten Objektträgers ausgestrichen, so dass der Blutstropfen zum Ende hin ausgedünnt wurde. Die Ausstriche wurden an der Luft getrocknet, fixiert und mit der Giemsa-Färbemethode (Servicelabor, Uniklinik Köln, Abteilung Dermatologie und Venerologie (Routine)) gefärbt. Die Giemsa-Lösung besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methanol mit Glycerin als Stabilisator. Zellkerne erschienen in den Ausstrichen durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA purpurrot. Das Zytoplasma wurde bläulich angefärbt. Die Zusammensetzung der weißen Blutkörperchen wurden mit einem Leica DM 4000B Mikroskop ausgewertet.

2.2.17 Isolierung der RNA aus Hautzellen

Gefrorene Hautstücke von 2 und 3 Tage alten K14-Cre-IKK2^{FL/FL}- und Kontrollmäusen wurden in je ca. 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) mit einem Homogenisator homogenisiert. Die Proben wurden für 5 min bei 15 bis 30 °C im Inkubationsschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben 0,2 ml Chloroform zugegeben. Anschließend wurden sie per Hand 15 sek. kräftig geschüttelt und bei einer Temperatur von 15-30 °C 15 min inkubiert. Darauf wurden die Proben bei 12.000 x g für 15 min bei 2-8 °C zentrifugiert. Die dabei entstandene wässrige Phase (RNA) wurde abgenommen und die RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Die Proben wurden bei 15-30 °C für 10 min inkubiert und danach bei 12.000 x g für 10 min bei 2-8 °C

zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin entfernt und dem Pellet Ethanol (75 %) zugegeben und durch vortexen gemischt. Darauf wurde die Probe bei $7.500 \times g$ 5 min bei $2 - 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das erhaltene RNA-Pellet der Proben wurde mit einem RNeasy mini Kit (250) (Qiagen) nach dem Protokoll von Qiagen gereinigt.

2.2.18 Affymetrix Gene Chip Analyse

Die Analysen der Genexpression in der Haut von K14-Cre-IKK2^{FL/FL}- und Kontrollmäusen wurden ausgeführt in Kollaboration mit dem Service-Labor vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Westfälische Wilhelms-Universität Münster. Es wurden Affymetrix Murine Genome U74Av2 Arrays und GeneChip test 3 Arrays verwendet. Die RNA-Proben wurden aus der Haut von 2 und 3 Tage alten K14-Cre-IKK2^{FL/FL}- und Kontrollmäusen mit Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) extrahiert und mit einem RNA Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die cDNA-Synthese, das Labeling und die Hybridisierung wurden ausgeführt gemäß den Instruktionen des Herstellers unter der Verwendung des „superscript choice system“ (Invitrogen) und des „Enzo high-yield RNA transcript labeling kit (Affymetrix).

2.2.19 Herstellung der Proteinproben für die Western Blot Analyse aus der Maushaut

Es wurden 6 mm Hautstanzen aus der Maushaut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL}- und Kontrollmäusen entnommen. Die ausgestanzten Proben wurden im flüssigen Stickstoff mit einem Mörser zermalm. Die zermalmten Proben wurden in jeweils ein Reaktionsgefäß überführt. Zu den Proben wurden 300 μl RIPA-Puffer und 3 μl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) gegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Die Proben wurden danach 10 min bei maximaler Umdrehung der Tischzentrifuge zentrifugiert. Im Überstand war das Proteinextrakt vorhanden und wurde für die Western Blot Analyse verwendet.

2.2.20 Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteinextrakte

Zur Analyse der Proteinextrakte wurden gleiche Proteinmengen mit Probenpuffer versetzt, 5 min aufgekocht und in 4-12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Invitrogen, Karlsruhe). Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe eines Tankblotsystems (Invitrogen, Karlsruhe) auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Freiburg, Deutschland) übertragen.

2.2.21 Immundetektion von Proteinen

Die Membran wurde anschließend für 2 h bei RT in einer Magermilchlösung (5 % fettfreies Milchpulver/TBS, 0,1 % Tween 20 (TBST)) blockiert. Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper anti-Maus-pERK1/2 (1:500) in 5 % Magermilchlösung in TBST ü.N. bei 4 °C im Schüttler inkubiert. Die Proteinbanden wurden mit dem HRP konjugierten sekundären Antikörper (Sigma, Taufkirchen) in Magermilchlösung für 1h bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 20 min in TBST bei RT gewaschen und mit dem Chemilumineszens Reagenz Plus Kit (Perkin ElmerTM, Rodgau) auf Röntgenfilmen entwickelt. Als Ladekontrolle wurde anschließend ERK2 (Santa Cruz Biotechnology) (1:500) benutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Lokalisierte entzündliche Hauterkrankung durch induzierte oder spontane Deletion von I kappa B Kinase 2 (IKK2) in der Epidermis der Maus

3.1.1 Tamoxifen induzierte Deletion von IKK2 in der Mausepidermis

Mäuse mit IKK2 epidermis-spezifischer Deletion (Pasparakis et al., 2002) sterben im Alter von 9-11 Tagen (postnatal P9-P11). Mit diesem Mausmodell ist es deshalb nicht möglich, die Auswirkungen einer Deletion von IKK2 in der Haut von adulten Mäusen zu erforschen. Um die Deletion von IKK2 zu einem späteren Zeitpunkt in der Epidermis von adulten IKK2^{FL/FL} Mäusen zu induzieren, wurde in die Mäuse eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines humanen Keratin 14 Promotors (K14-Cre-ER^{T2}) eingekreuzt (Indra et al., 2000). Durch die Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase kann die Transkription von Cre posttranslational reguliert werden. Cre-ER^{T2} ist eine Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinase, die aus Cre und einer Ligandenbindungsdomäne des mutierten humanen Östrogen-Rezeptors besteht. Die mutierte Bindungsdomäne hat keine Affinität zu Östrogenen und bleibt inaktiv. Stattdessen kann der synthetische Ligand Tamoxifen an die Domäne binden (Feil et al., 1996; Feil et al., 1997). Erst durch die Verabreichung von Tamoxifen wird die Expression von Cre-ER^{T2} aktiviert. Wird Tamoxifen auf der Haut lokal begrenzt eingesetzt, kann zusätzlich die Region der Cre-ER^{T2}-Aktivierung bestimmt werden. Durch Kreuzung von K14-Cre-ER^{T2}- und IKK2^{FL/FL} Mäusen wurden K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse generiert, die eine örtliche und zeitliche Deletion von IKK2 in der Epidermis erlauben.

3.1.2 Spontan induzierte, Cre-vermittelte Deletion von IKK2 und die Entstehung von Hautläsionen in K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Neugeborene K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse zeigen bis zu einem Alter von sechs Monaten keine Zeichen einer Hauterkrankung und entwickeln sich

normal. Circa sechs Monate nach ihrer Geburt gibt es eine spontan induzierte K14-Cre-ER^{T2} vermittelte Deletion von IKK2. Die Haut der K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse verdickt sich zuerst um Schnauze und Nacken und bei einigen Tieren zeigen diese Stellen eine leichte Rötung. Diese Läsionen entwickeln sich zu hyperkeratotischen Plaques und es kommt stellenweise zu Ulzerationen. Bei den meisten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen vergrößern sich die Läsionen und breiteten sich auf Schulter, Hals, Kopf und Brust aus (Abbildung 3.1).



Abbildung 3.1. Spontan induzierte K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Maus

Makroskopischer Phänotyp einer Maus mit spontan induzierter Deletion von IKK2 in der Epidermis nach sechs Monaten. Der Nacken zeigt eine stark entzündete, verdickte, verkrustete Haut mit einem Verlust der Fellhaare.

Nach spätestens neun Monaten entwickelten alle K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse (20 untersuchte Tiere) spontan diesen Phänotyp. Dabei variiert die Größe und Schwere ihrer Läsionen. Eine K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Maus zeigte den Phänotyp bereits nach drei Monaten. Es konnte beobachtet werden, dass sich die K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse fortwährend an ihren Läsionen

kratzen. Das lässt darauf schließen, dass die Läsionen möglicherweise einen starken Juckreiz auslösen.

Für die PCR-Analyse wurden Hautproben von spontan induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen aus unterschiedlichen Stellen des Körpers verwendet. Die PCR-Analyse der Hautproben von Schwanz, Rücken, Nacken, Kopf und Bauch zeigt, dass eine spontane Cre-vermittelte Deletion von IKK2 in der Haut der K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse stattgefunden hat (Abbildung 3.2a).

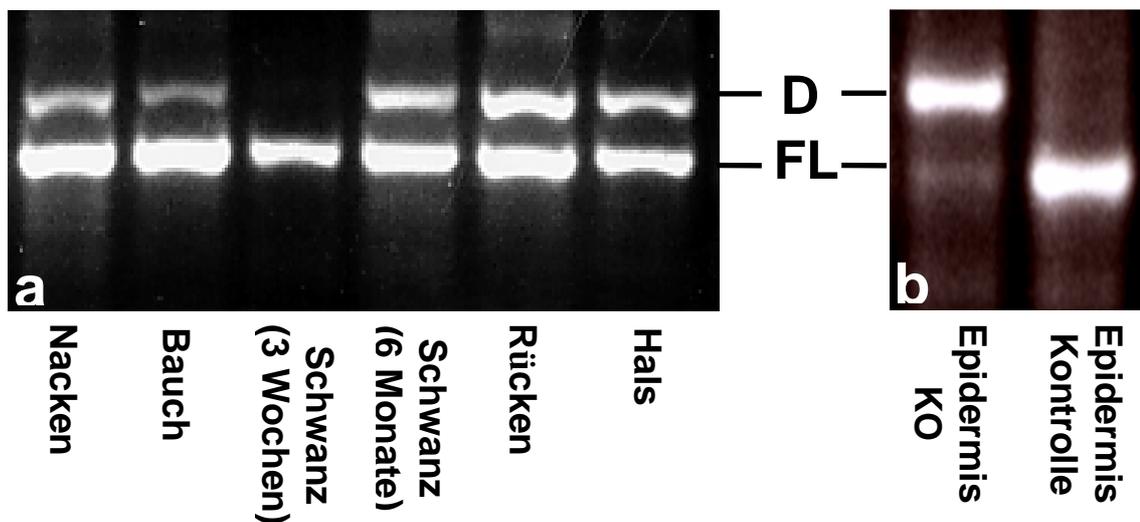


Abbildung 3.2: DNA-PCR-Analyse von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL}-Mäusen

PCR-Analyse der DNA, isoliert aus der Haut verschiedener Körperstellen einer spontan induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Maus nach sechs Monaten und einer K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Maus nach drei Wochen (a), oder aus der abgetrennten Epidermis vom Ohr einer Maus mit spontaner IKK2-Deletion und einer Kontrolle nach sechs Monaten (b). Die Deletion (D) von IKK2 wird durch die obere PCR-Bande (652 bp) angezeigt. Die untere PCR-Bande (533 bp) kennzeichnet die geflochtenen Allele (FL). Die DNA der Schwanzbiopsie einer drei Wochen alten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Maus stellt die Kontrolle zu den spontan induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen dar (a). Die schwache PCR-Bande in Abbildung 3.2b mit der erwarteten Größe für das geflochte Allel ist möglicherweise das Resultat von in die Epidermis eingewanderten Immunzellen.

Da die geflochtenen IKK2-Allele in der Dermis nicht durch die spezifische K14-Cre-ER^{T2} deletiert werden, wird trotz vollständiger Deletion von IKK2 in der Epidermis weiterhin eine geflochte Bande detektiert. Um zu untersuchen, ob die spontane Deletion der IKK2-Allele in den Läsionen vollständig ist, wurde die Haut vom entzündeten Ohr einer acht Monate alten, spontan induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Maus abgetrennt. Für die PCR-Reaktion wurde die

Epidermis von der Dermis getrennt. Die extrahierte DNA aus der Epidermis wies in der PCR-Analyse eine deutlich deletierte Bande auf. Auf der Höhe des geflochten Alleles (siehe Kontrollmaus) ist nur eine undeutliche, sehr schwache Bande zu erkennen (Abbildung 3.2b). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies das Resultat von eingewanderten Immunzellen in die Epidermis ist (siehe auch Abbildung 3.6a und c). Das könnte bedeutet, dass in den Läsionen die Cre-vermittelte Deletion von IKK2 in allen epidermalen Keratinozyten vollständig ist. Die spontan induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse zeigen im Alter von 0–12 Wochen in der PCR-Analyse keine K14-Cre-ER^{T2} vermittelte Deletion von IKK2 (Bsp. Abbildung 3.2a, Schwanzbiopsie nach 3 Wochen). Daher konnte in K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen bis zu einem Alter von drei Monaten die Tamoxifen-induzierte, kontrollierte Deletion von IKK2 durchgeführt werden (siehe 3.1.3). In einigen K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen, die älter als drei Monate waren, konnte eine deletierte PCR-Bande nachgewiesen werden, obwohl sie noch keine Hautläsionen zeigten. Auch phänotypisch unauffällige Hautstellen von spontan induzierten Tieren, die Läsionen ausgebildet hatten, zeigten in der PCR-Analyse (Abbildung 3.2a, z.B. Bauch) eine deletierte Bande.

3.1.3 Tamoxifen induzierte Deletion von IKK2 in der Epidermis von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Um K14-Cre-ER^{T2} kontrolliert zeit- und ortsabhängig zu aktivieren, wurden sechs Wochen alte K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} - und Kontrollmäuse (IKK2^{FL/FL} oder IKK2^{FL/+}) mit Tamoxifen behandelt. An fünf aufeinander folgenden Tagen wurde der Rücken der Tiere mit einer Lösung von 1 mg Tamoxifen in 0,2 ml Ethanol bestrichen. Nach drei Wochen war an den behandelten Stellen der Verlust der Haare und eine leicht rötliche Schuppung (Läsionen) zu erkennen. Diese Läsionen entwickelten sich zu verdickten, schuppigen Plaques, die denen der spontan induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen ähnelten (Abbildung 3.3a). Die mit Tamoxifen behandelten Kontrollmäuse dagegen zeigten keinerlei Veränderungen (Abbildung 3.3b).

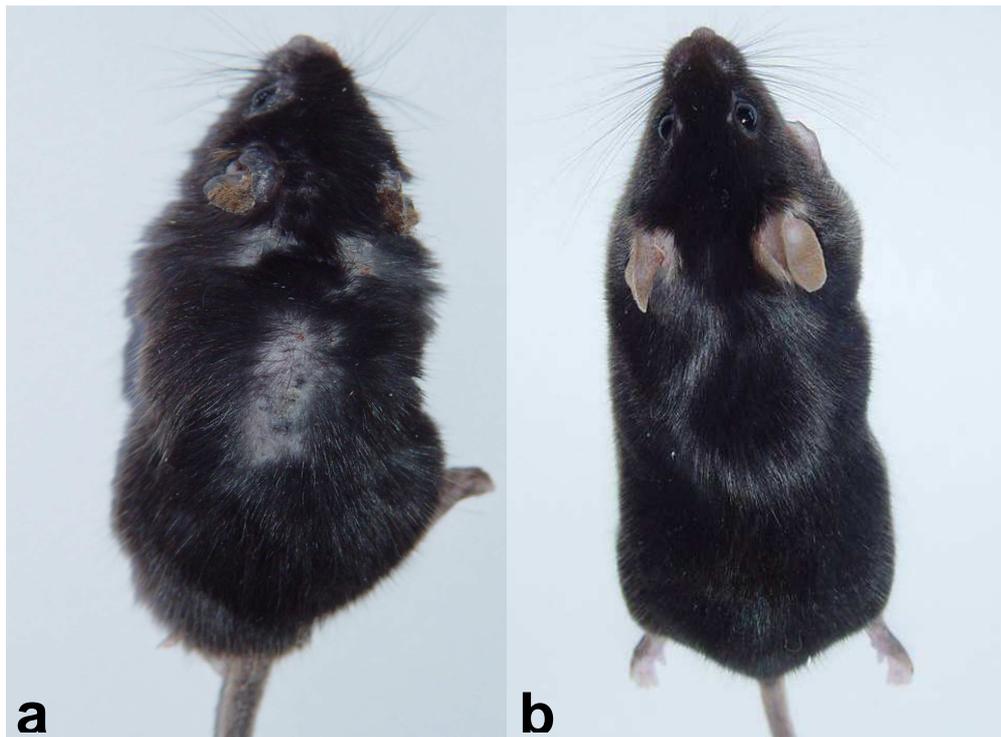


Abbildung 3.3: Tamoxifen behandelte $K14\text{-Cre-ER}^{T2}/IKK2^{FL/FL}$ - und Kontrollmaus

Makroskopischer Phänotyp von Mäusen mit Tamoxifen induzierter Deletion von $IKK2$ in der Epidermis (a), und einer Tamoxifen behandelten $IKK2^{FL/FL}$ -Kontrollmaus nach fünf Wochen (b). Die auf dem Rücken mit Tamoxifen behandelte $K14\text{-Cre-ER}^{T2}/IKK2^{FL/FL}$ Maus (a) zeigte dort entzündete schuppige Hautstellen mit einem Verlust der Fellhaare.

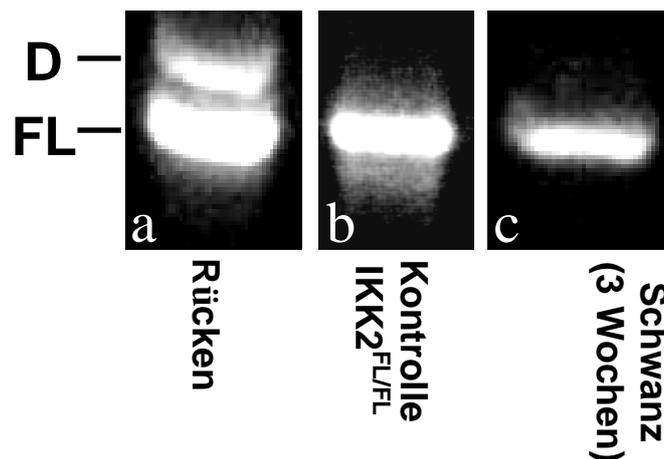


Abbildung 3.4: DNA-PCR-Analyse von Tamoxifen behandelten $K14\text{-Cre-ER}^{T2}/IKK2^{FL/FL}$ -Mäusen

PCR-Analyse der DNA, isoliert aus Tamoxifen behandelter Haut vom Rücken einer fünf Wochen alten $K14\text{-Cre-ER}^{T2}/IKK2^{FL/FL}$ Maus (a), aus Tamoxifen behandelter Haut vom Rücken einer $IKK2^{FL/FL}$ Kontrollmaus (b) und DNA, isoliert aus einer Schwanzbiopsie einer drei Wochen alten unbehandelten $K14\text{-Cre-ER}^{T2}/IKK2^{FL/FL}$ Maus (c). D: Deletiert; FL: Gefloxt

Die PCR-Analyse der Hautbiopsien dieser Mäuse zeigt, dass eine Cre vermittelte Deletion von IKK2 in den Tamoxifen behandelten Arealen stattgefunden hat (Abbildung 3.4).

Die Tiere wurden nach drei bzw. fünf Wochen getötet, um eine histologische Analyse an den entstandenen Hautläsionen vorzunehmen.

3.1.4 Histopathologische Untersuchung der Hautläsionen von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL}

Untersucht wurden zehn K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit einer spontanen Deletion von IKK2 in der Epidermis und sechs Mäuse mit einer durch Tamoxifenbehandlung induzierten Deletion. Die mikroskopische Untersuchung von Haematoxylin/Eosin gefärbten Hautschnitten zeigt eine starke Verdickung der Epidermis (Ankanthose) und eine Verdickung der Hornschicht (Hyperkeratose). Die verdickte Hornschicht enthält viele Keratinozyten, die Zellkerne in ihren Zellen aufweisen (Parakeratose). Der unvollständige Abbau der Zellkerne ist ein Hinweis auf eine unvollendete Differenzierung der epidermalen Keratinozyten (Abbildung 3.5a, c). Abbildung 3.5a (drei Wochen nach Tamoxifen-Induktion) zeigt das Anfangsstadium dieser Entwicklung und Abbildung 3.5c (fünf Wochen nach Tamoxifen-Induktion) den drastischen Fortschritt. Das Bindegewebe der Dermis weist eine erhöhte Zelldichte auf. In schweren Läsionen kann eine Zunahme von Kollagenfasern beobachtet werden, die die oberen Teile des subkutanen Fett ersetzen (Abbildung 3.5b, c, e und h). Alle Hautläsionen zeigen deformierte Haarfollikel, aus denen sich in der oberen Dermis Zysten bilden, die mit eosinophilem Material gefüllt sind (Abbildung 3.5d und e). In einzelnen Hautschnitten der spontan induzierten sowie Tamoxifen behandelten Mäuse gibt es Strukturen, die invasiven Tumoren gleichen und Ähnlichkeiten zu humanen Basalzell-Karzinomen (Abbildung 3.5c) oder hoch differenzierten Plattenepithelkarzinomen aufweisen (Abbildung 3.5d). Eine nähere Untersuchung einzelner Zellen mit einer starken Vergrößerung zeigt jedoch, dass weder polymorphe noch dyskeratotische Zellen in diesen Strukturen vorhanden sind (Abbildung 3.5f).

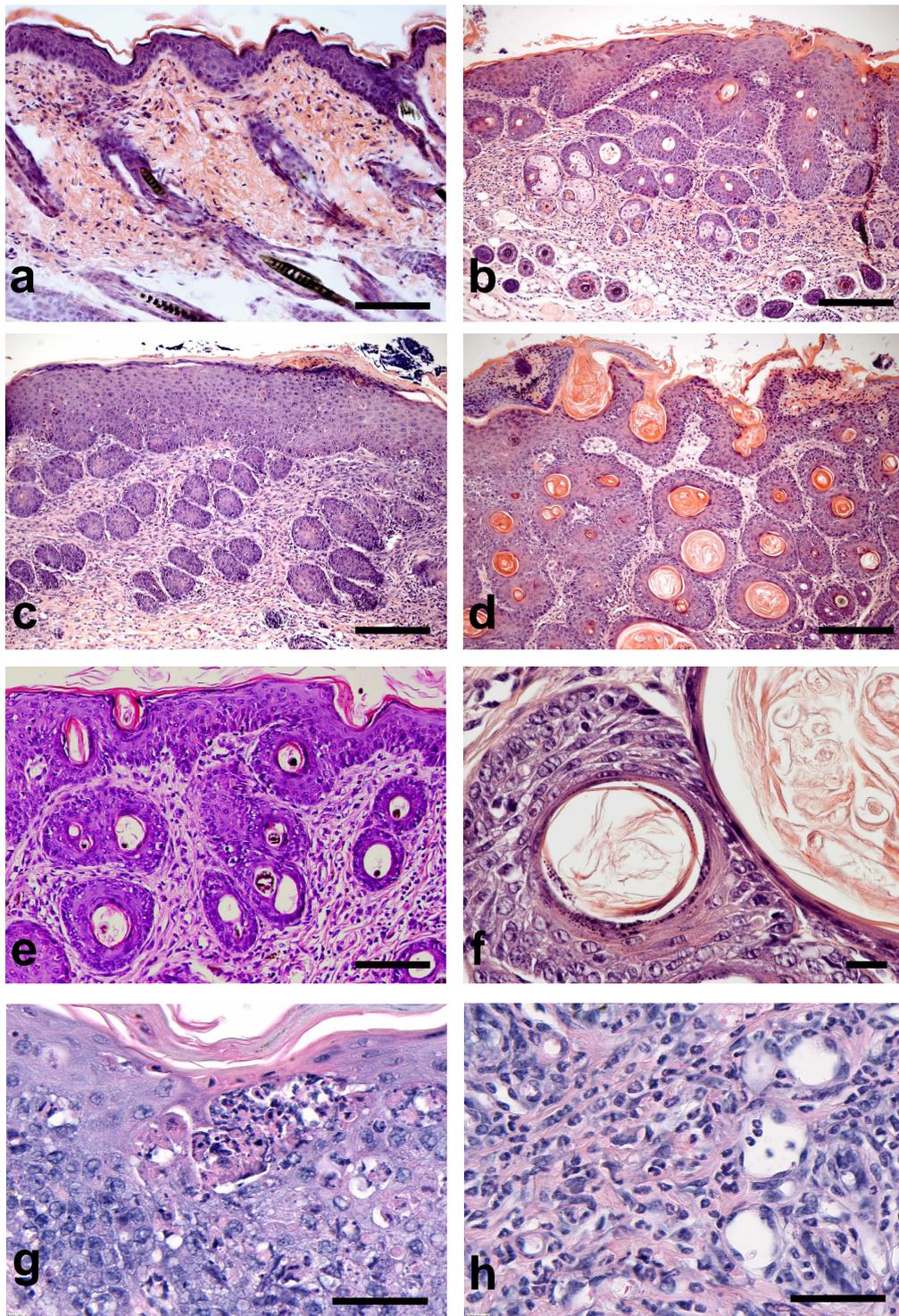


Abbildung 3.5: Darstellung des histopathologischen Phänotyps von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen mit lokaler epidermisspezifischer Deletion von IKK2.

Die Abbildungen zeigen Hautschnitte von induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen drei Wochen (a) und fünf Wochen (c, e) nach Behandlung mit Tamoxifen, sowie Hautschnitte von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen mit einer spontan induzierten Deletion von IKK2 (b, d, f, g, h). Die Hautschnitte wurden mit Haematoxylin/Eosin (H/E) angefärbt. Skalierungsbalken: a, 100 μ m; b, c, d, e, 200 μ m; f, 20 μ m; und h, 50 μ m.

3.1.5 Immunohistologische Analyse der Entzündungszellen in der Haut von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Die erhöhte Zelldichte in der Dermis der K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse ist offensichtlich auf eine Ansammlung von Entzündungszellen zurückzuführen. Um die unterschiedlichen Arten von Immunzellen im entzündlichen Infiltrat der Dermis zu analysieren, wurden Hautschnitte von Läsionen der Tamoxifen induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit Antikörpern gegen Makrophagen (F4/80), Granulozyten (GR1) und T-Lymphozyten (CD3) angefärbt. Die Färbungen der Hautschnitte von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen mit F4/80 zeigen im Gegensatz zur Kontrolle ein massives Einwandern von Makrophagen in die obere Schicht der Dermis und häufig sogar ein Eindringen in die Epidermis (Abb. 3.6a und b). Die GR1-Färbung zeigt, dass ebenfalls eine große Anzahl von Granulozyten in die Dermis und Epidermis migrieren (Abbildung 3.6c und d). Diese bilden Mikroabszesse innerhalb und unterhalb der äußersten Hautschicht (Abbildung 3.5g). In einigen Hautproben enthielt das Infiltrat zusätzlich CD3 positive T-Lymphozyten in der oberen Dermis und Epidermis (Abbildung 3.6e). Die Anzahl der CD3-positiven T-Lymphozyten variiert in den verschiedenen Hautproben und ist deutlich geringer als die Zahl der Makrophagen und Granulozyten.

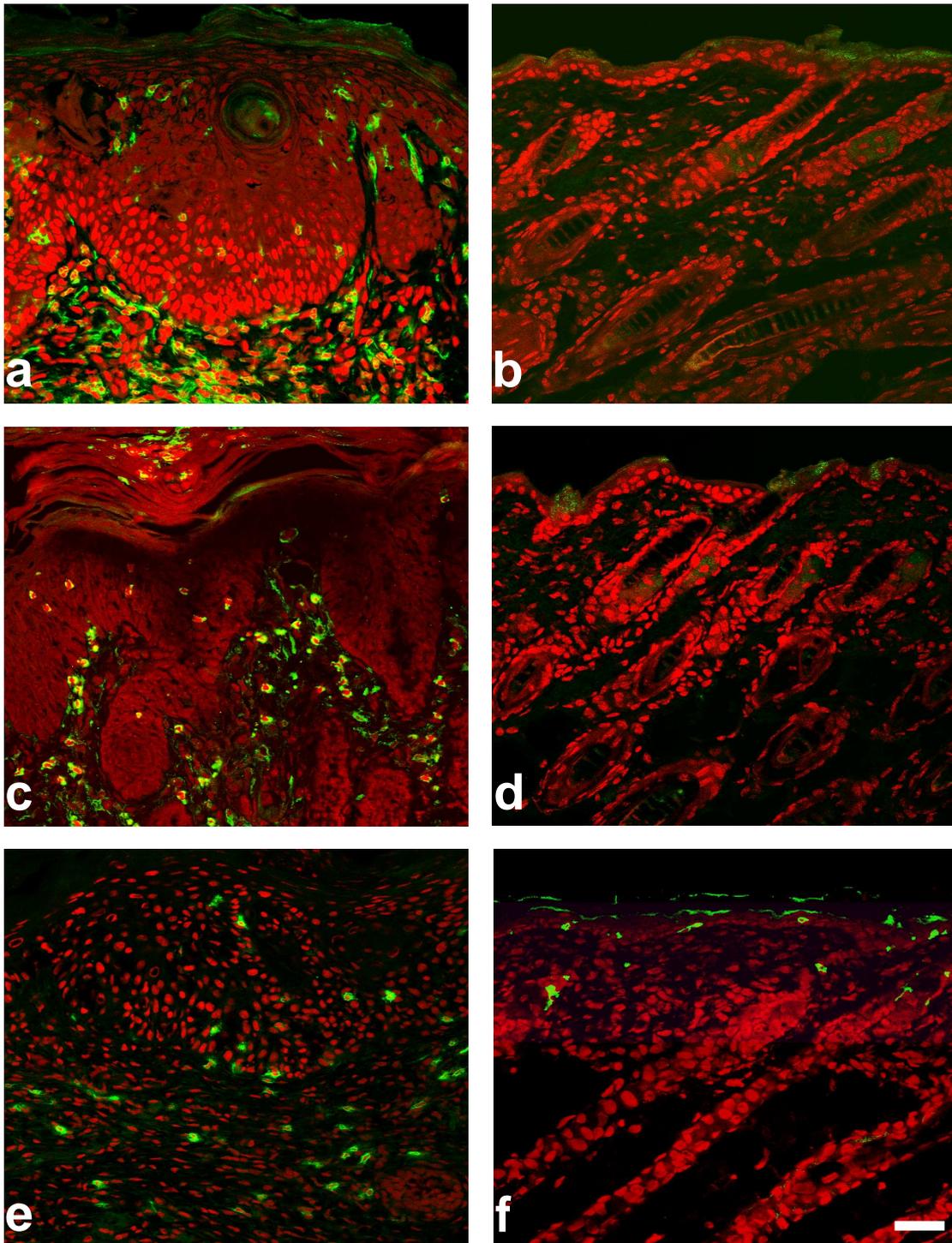


Abbildung 3.6: Darstellung des immunohistopathologischen Phänotyps von $K14\text{-Cre-ER}^{T2}/IKK2^{FL/FL}$ Mäusen mit lokaler epidermisspezifischer Deletion von IKK2.

Die Hautschnitte **a-f** wurden mit Antikörpern gegen Marker für Entzündungszellen angefärbt (grün), Makrophagen (F4/80) (**a, b**), Granulozyten (Gr-1) (**c, d**) und CD3-positive Lymphozyten (CD3) (**e, f**). Die Hautschnitte wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt (rot) um die Zellkerne darzustellen. Abgebildet sind Hautschnitte von $K14\text{-Cre-ER}^{T2}/IKK2^{FL/FL}$ Mäusen mit spontaner (**a** und **c**) und Tamoxifen induzierter (**e**) Deletion von IKK2. Die Abbildungen **b, d** und **f** sind die entsprechenden Tamoxifen behandelten $IKK2^{FL/FL}$ Kontrollen. Skalierungsbalken: **a-f**, 40 μm .

3.1.6 Gestörte Proliferation und epidermale Differenzierung in K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Der histologische Phänotyp der Haut von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen weist auf ein Ungleichgewicht zwischen der Keratinozyten-Proliferation und Differenzierung in der Haut dieser Tiere hin. Deshalb wurde die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in der Epidermis von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen untersucht (Abbildung 3.7).

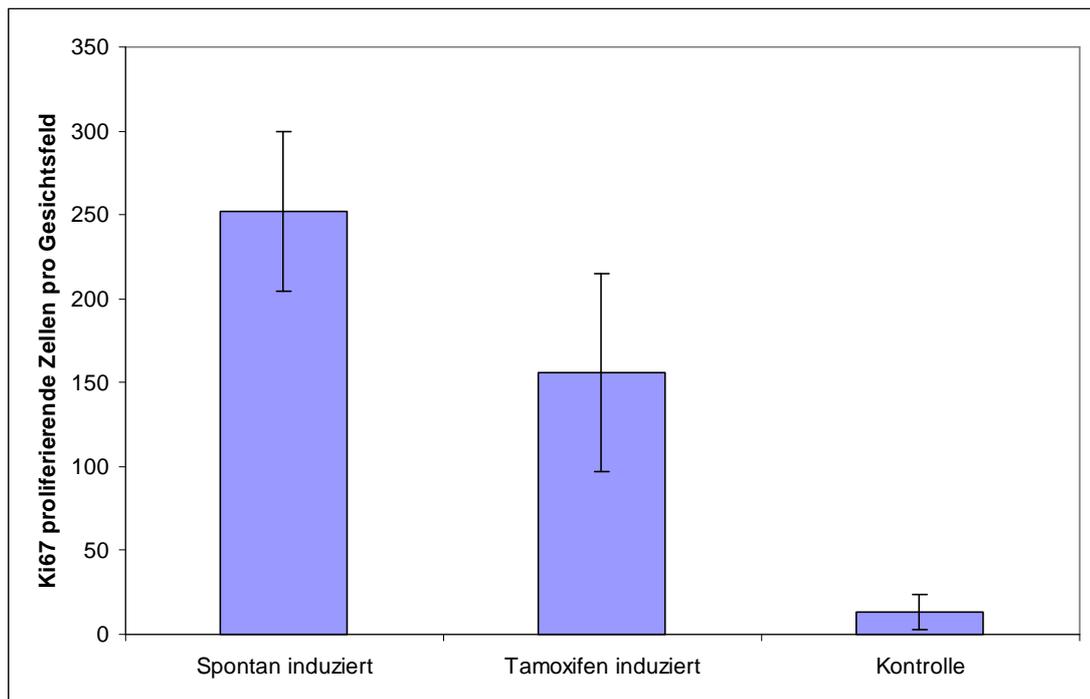


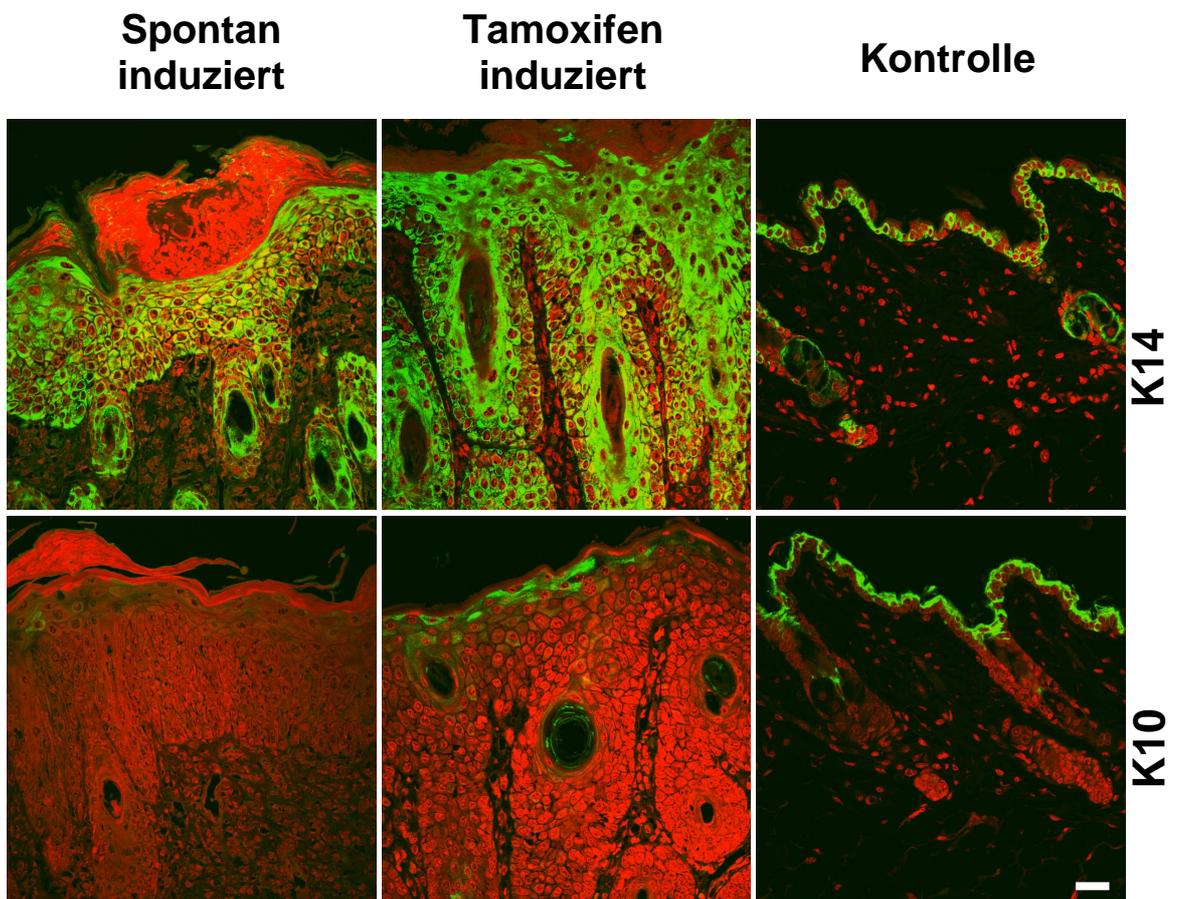
Abbildung 3.7: Proliferation in der Epidermis von zwei spontan induzierten und zwei Tamoxifen induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen und zwei Kontrollmäusen.

Die Hautschnitte wurden mit dem Proliferationsmarker Ki67 angefärbt. Es wurden je Maus 10 Hautschnitte ausgewertet. Pro Hautschnitt wurden unter dem Mikroskop (Vergrößerung 40 x 0,95) 20 Gesichtsfelder ausgezählt und der Durchschnitt aus jeder Gruppe pro Gesichtsfeld berechnet.

Das Ki-67 Antigen wird von proliferierenden Zellen in der G1-, S-, G2- und M-Phase exprimiert. Zellen, die in der G0-Phase sind (ruhende Zellen) exprimieren das Ki-67 Antigen nicht, so dass Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in der Haut gewonnen werden kann. Es wurde die Anzahl der Ki-67-positiven Zellkerne in Hautschnitten von je zwei Mäusen aus der Gruppe der spontan induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse, der Tamoxifen induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse und der

Kontrollmäuse bestimmt. Dazu wurden je 20 mikroskopische Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 40 x 0,95 ausgezählt. Die Auswertung zeigt, dass die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen in den betroffenen Hautläsionen der spontan induzierten Tiere 19-fach und der Tamoxifen induzierten Tiere 12-fach höher ist als in der Haut der Kontrolltiere (Abbildung 3.7)

Um das Differenzierungsverhalten der Epidermis zu untersuchen, wurden immunhistologische Färbungen mit Antikörpern gegen Keratin 14, Keratin 10 und den späten Differenzierungsmarkern Filaggrin und Loricrin durchgeführt (Abbildung 3.8). Die Expression von Keratin 14 ist in den Kontrollmäusen auf die basale Schicht der Epidermis begrenzt. In den K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen dagegen wird in allen Schichten der Epidermis Keratin 14 exprimiert. Die Expression der späten Differenzierungsmarker Keratin 10, Filaggrin und Loricrin ist in der Epidermis der K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse verglichen zu den Kontrollen stark gestört oder nicht mehr vorhanden.



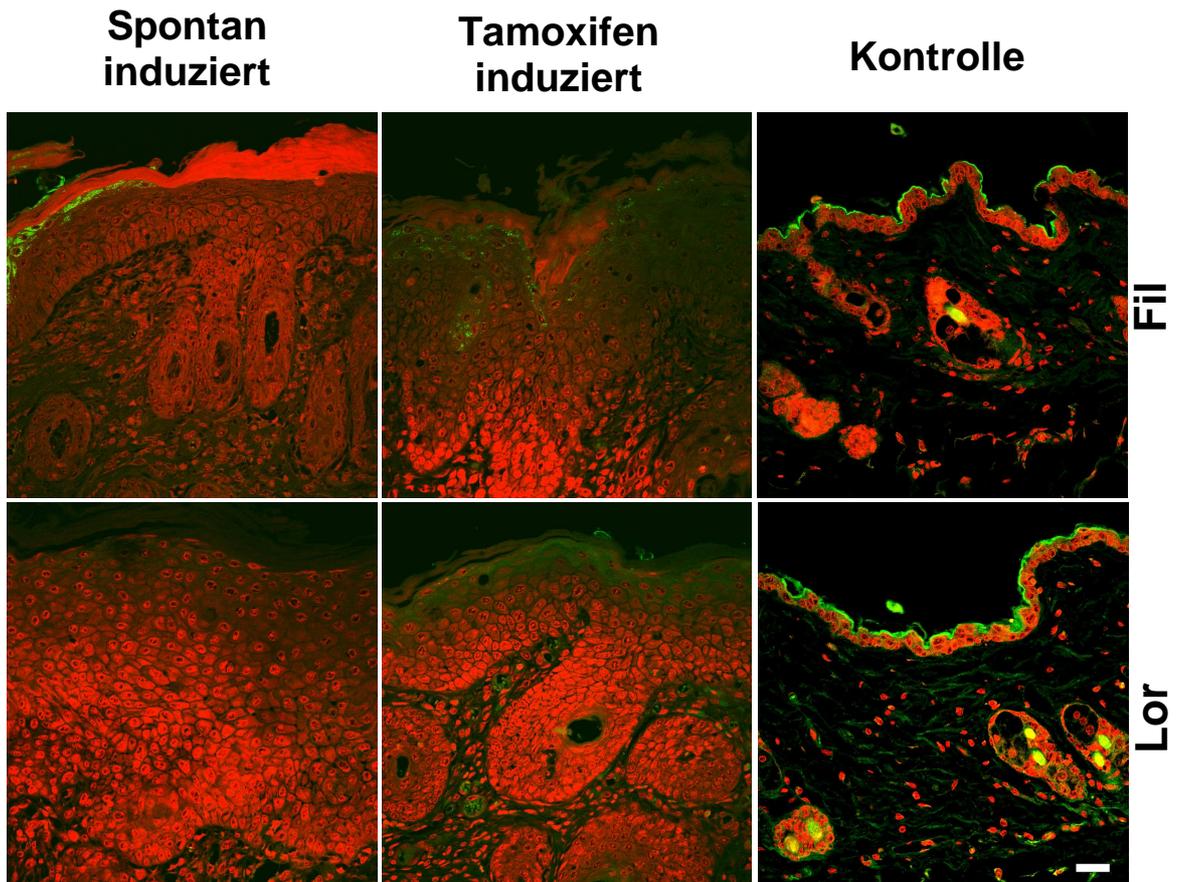


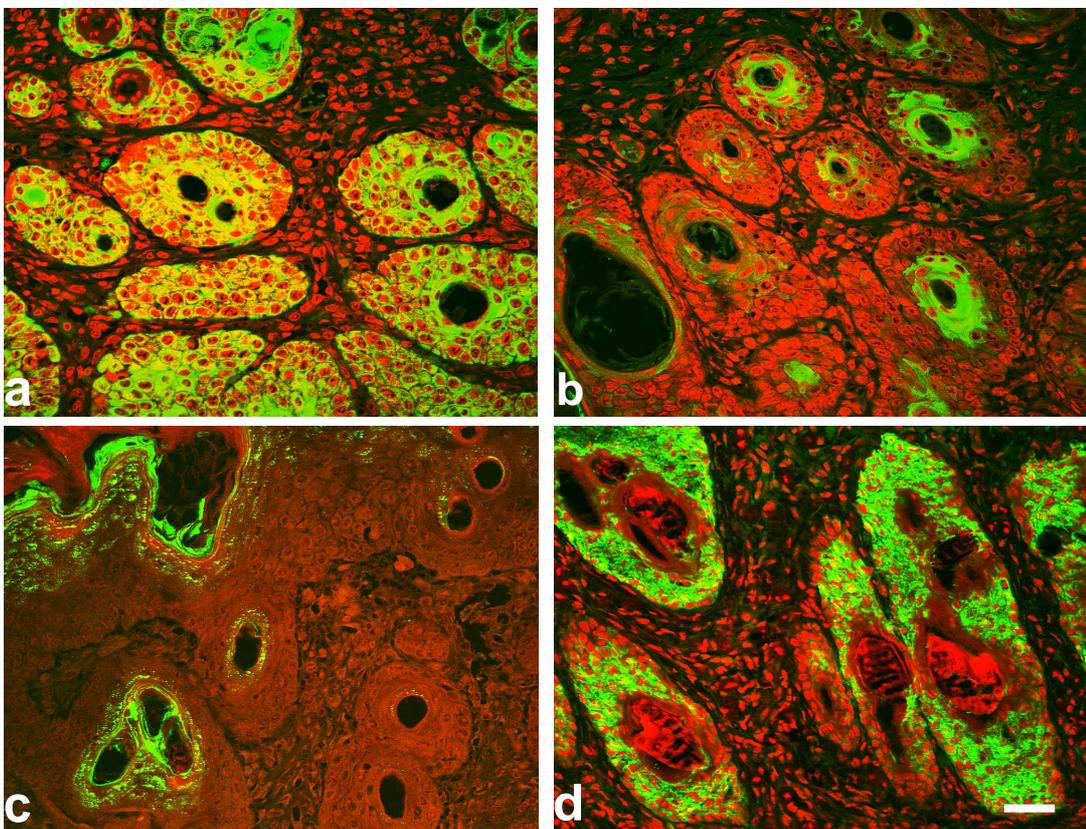
Abbildung 3.8: Analyse der epidermalen Differenzierungsmarker in Mäusen mit epidermisspezifischer Deletion von IKK2.

Darstellung der Hautschnitte von spontan induzierten (*linke Spalte*) und Tamoxifen induzierten (*mittlere Spalte*) K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen, sowie von Kontrollmäusen (*rechte Spalte*). Die Hautschnitte wurden immunhistologisch mit Antikörpern gegen epidermale Differenzierungsmarker (grün); Keratin 14 (K14), Keratin 10 (K10), Filaggrin (Fil) und Loricrin (Lor) angefärbt. Die Hautschnitte wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt (rot) um die Zellkerne sichtbar zu machen. Skalierungsbalken: 40 μ m.

3.1.7 Haarfollikelschädigung aber keine Bildung von Tumoren in der Haut von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Um zu untersuchen, ob die pseudoinvasiven epithelialen Zellformationen in der Dermis der K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse echte Tumore darstellen, wurden immunhistologische Färbungen mit Antikörpern gegen Marker der interfollikularen- und Haarfollikel-Differenzierung durchgeführt. Alle epithelialen Zellformationen in der Dermis zeigen eine positive Keratin 14 Färbung, was auf den epidermalen Ursprung dieser Zellformationen hinweist (Abbildung 3.9a). Zusätzlich lassen sich viele dieser Formationen mit einem Antikörper gegen Keratin 10 und Filaggrin anfärben (Abbildung 3.9b und c). Das deutet

auf eine interfollikuläre epidermale Differenzierung hin, wie sie bei Zysten beobachtet wird. Zusätzlich wurde mit einem Antikörper gegen das CAAT displacement enhancer protein (CDP) gefärbt. CDP ist ein Repressor, der unter anderem bei Prozessen der terminalen Differenzierung eine Rolle spielt und für die Morphogenese der Haarfollikel wichtig ist. Die epithelialen Zellformationen in der unteren und mittleren Dermis zeigen zum großen Teil eine positive Färbung mit Antikörpern gegen CDP und Keratin 6 (Abbildung 3.9d und g), wie sie in normalen Haarfollikeln zu finden ist (Abbildung 3.9h). Allerdings ist die Expression von Keratin 6 auch in der interfollikulären Epidermis im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung 3.9e und f). Um zu zeigen, dass die epithelialen Zellformationen keine invasiven Tumore darstellen, wurden die Zellformationen mit einem Antikörper gegen Laminin 5 angefärbt (Abbildung 3.9i und l). Laminin 5 ist in der intakten Basalmembran vorhanden. Die Färbung zeigt, dass alle Zellformationen von einer Laminin 5-positiven Basalmembran umhüllt sind. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die epithelialen Zellformationen nicht Teil eines invasiven Tumors sind, sondern Anteile entzündlich veränderter Haarfollikel.



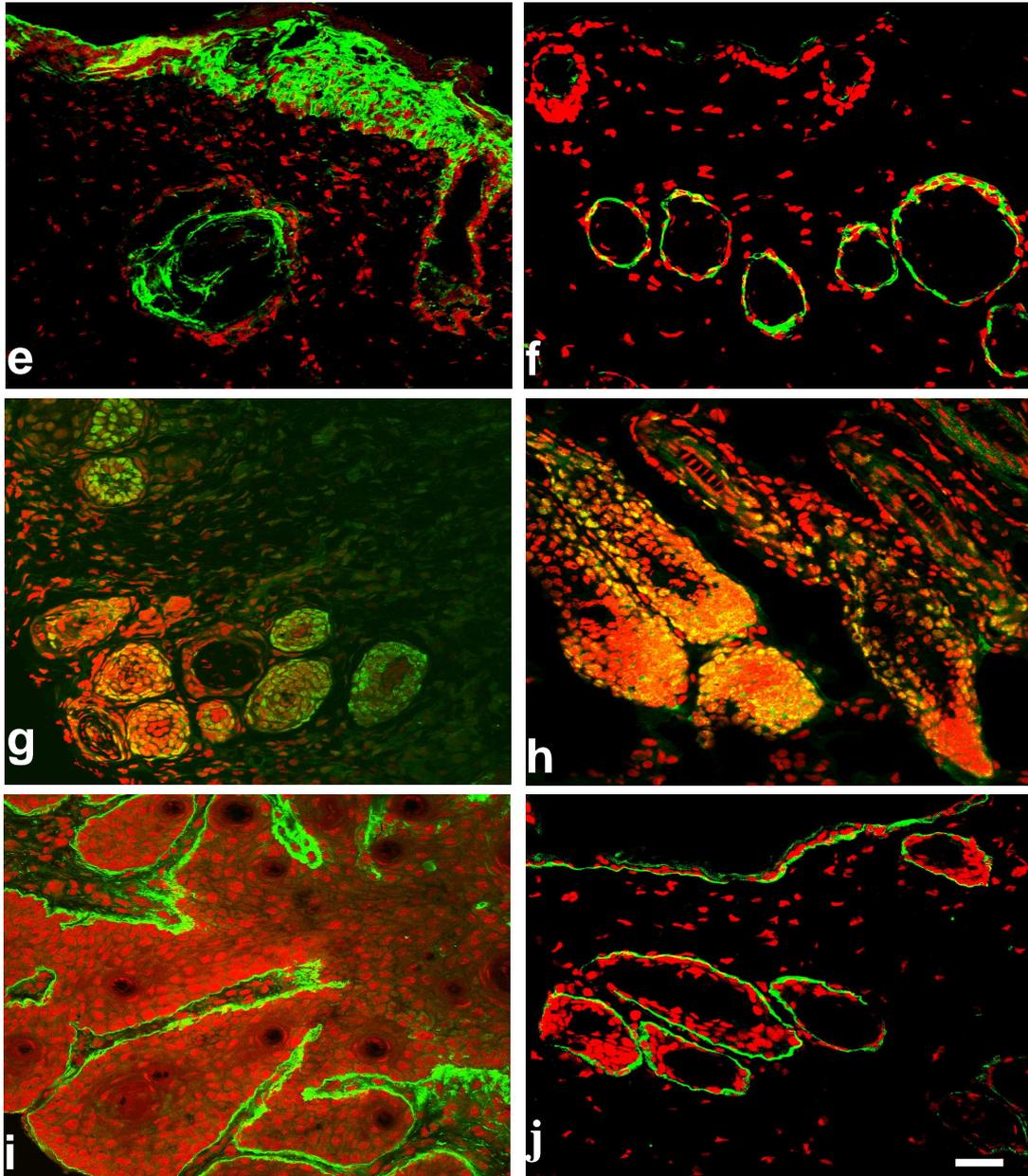


Abbildung 3.9: Darstellung der Haarfollikel in der Haut von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen.

Die Bilder zeigen Hautschnitte von Tamoxifen induzierten (c, e, g, i, j) und spontan induzierten (a, b, d) K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen, sowie Hautschnitte von Kontrollmäusen (f und h). Die grüne Färbung stellt immunhistologische Färbung von Keratin 14 (a), Keratin 10 (b), Filaggrin (c), Keratin 6 (d, e, f), CAAT displacement enhancer protein (CDP) (g, h) und Laminin 5 (i, j) dar. Die Hautschnitte wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt (rot), um die Zellkerne erkennbar zu machen. Skalierungsbalken: 40 μ m.

3.1.8 Signale der Hyperproliferation in epidermalen Keratinozyten bei K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

In Pasparakis et al. 2002 wurde beschrieben, dass die neugeborenen K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse eine hyperproliferative entzündliche Hauterkrankung zeigen, die der menschlichen Psoriasis sehr ähnelt. Als Signalmoleküle mit einer vermutlich wichtigen Funktion in der Pathogenese des psoriatischen Hautphänotyps werden die Extracellular Signal- Regulated Protein Kinases (ERK) 1/2 und Signal Transducer and Activator of Transkription 3 (STAT3) angesehen (Haase et al., 2001; Sano et al., 2005). Da der Phänotyp der erwachsenen induzierten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse dem der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse gleicht, wurde überprüft, ob diese Signaltransduktionswege in der phänotypisch veränderten Haut aktiviert sind. Dazu wurde *in situ* mit monoklonalen, phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gegen die aktivierten Formen von ERK1/2 und STAT3 gefärbt. Die Immunfärbung zeigt ein starkes nukleäres Signal für phosphoryliertes STAT3 in der hyperproliferierten Epidermis der untersuchten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit spontaner oder Tamoxifen-induzierter Deletion von IKK2 (Abbildung 3.10a). Die Kontrollen zeigen dagegen keine Aktivierung von STAT3 (Abbildung 3.10b). Bei drei von fünf untersuchten K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen ist in der Haut zusätzlich bei ERK 1/2 ein phosphorylierungsspezifisches Signal im Vergleich zu den Kontrollmäusen zu beobachten (Abbildung 3.10c und d). Die Phosphorylierung von ERK 1/2 konnte durch eine Western Blot Analyse sowohl aus Lysaten der betroffenen Hautareale der K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse als auch aus Lysaten der Haut von Kontrollmäusen bestätigt werden (Abbildung 3.10d).

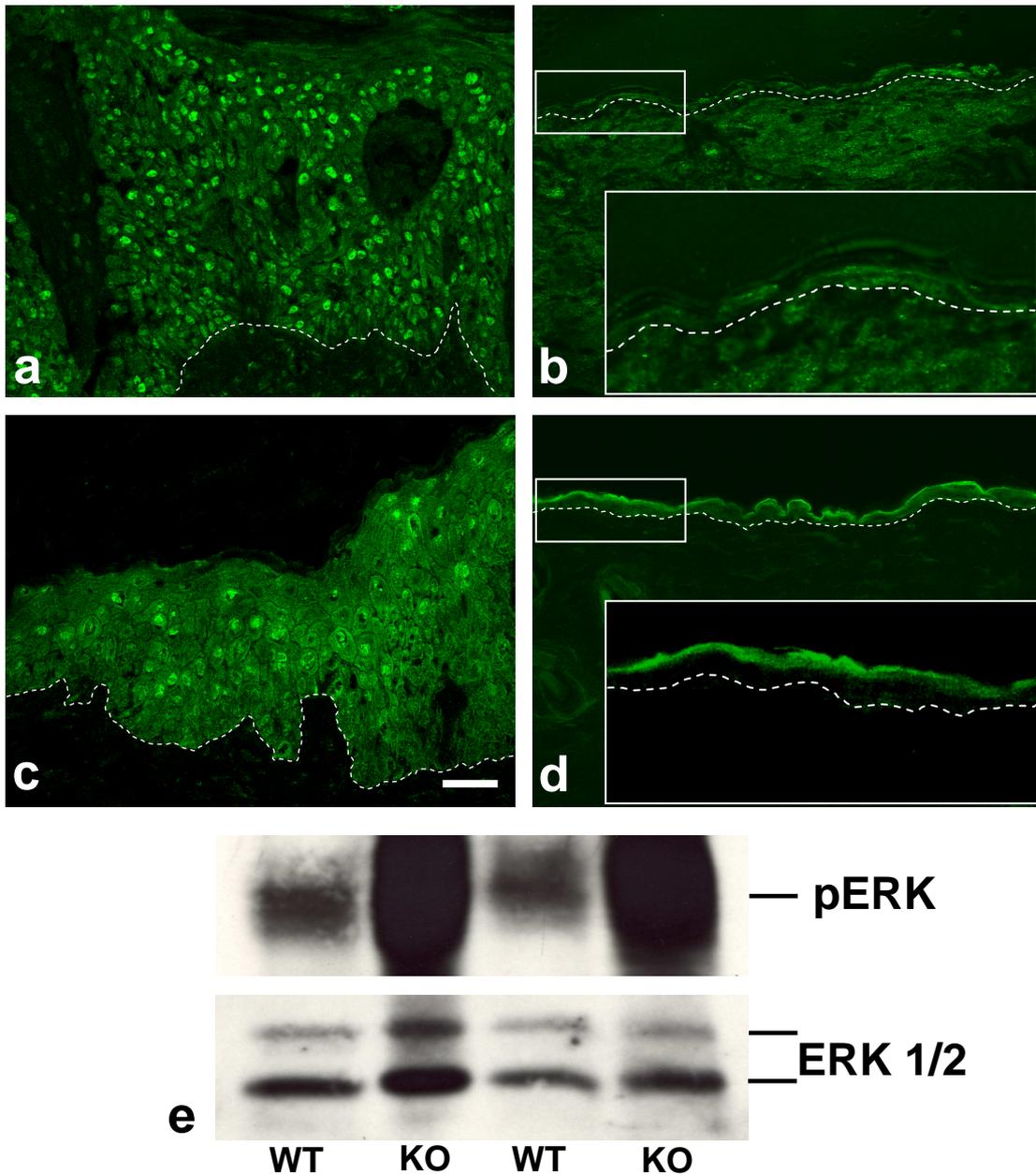


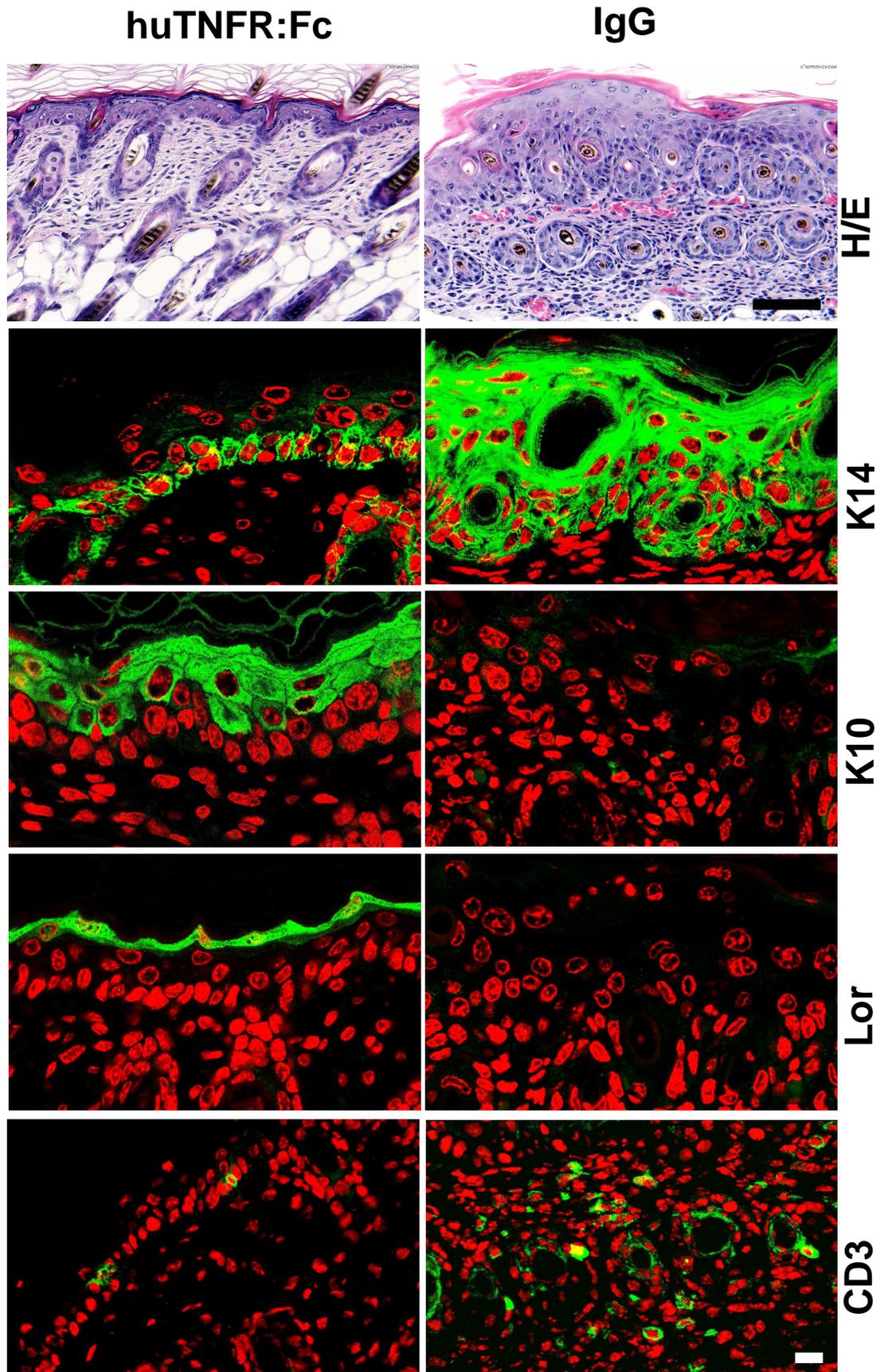
Abbildung 3.10: Signaltransduktion in der Haut von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen.

Die Bilder zeigen Hautschnitte von Tamoxifen induzierten (a) und spontan induzierten (c) K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen, sowie Hautschnitte von Kontrollmäusen (b und d). Gefärbt wurde mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gegen „phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) (a und b) und „phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2“ (ERK 1/2) (c und d). Die Ausschnitte in den Abbildungen b und d zeigen die jeweilige Epidermis stark vergrößert. Die gestrichelten weißen Linien markieren den Verlauf der Basalmembran. Skalierungsbalken: 40 μ m. Abbildung e zeigt die Western-Blot Analyse der ERK-Phosphorylierung in der Haut von zwei K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen (KO) und in der Haut von zwei Wildtypmäusen (WT). Die obere Reihe zeigt phosphoryliertes ERK 1/2 (pERK) und die untere Reihe die ERK 1/2 Ladekontrolle (ERK 1/2).

3.2 Pathogene Rolle von Immunzellpopulationen und Zytokinen in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen

3.2.1 Abschwächung des entzündlichen Hautphänotyps in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen durch die Hemmung von TNF

In Pasparakis et al., 2002 wurde gezeigt, dass der Psoriasis ähnliche Phänotyp der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse nicht ausgebildet wird, wenn das Gen für TNF Rezeptor-I deletiert wurde. Der Phänotyp wurde in K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/TNFR1^{-/-} Mäusen vollständig unterdrückt. Daher sollte die Behandlung der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit einem TNF-neutralisierenden Agens zu einem milderen Phänotyp führen. TNF-neutralisierende Therapeutika werden bereits in der Behandlung der Psoriasis beim Menschen erfolgreich eingesetzt. Für die Behandlung der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse wurde ein Fusionsprotein eingesetzt, das aus der extrazellulären Domäne des humanen p75-TNF-Rezeptors und dem Fc-Fragment aus humanem IgG (huTNFR:Fc) besteht. Dieses Fusionsprotein bindet an zirkulierendes TNF und neutralisiert es. Den Mäusen wurde täglich (P1 bis P7) 20 µg/d huTNFR:Fc subkutan in die Haut injiziert. Insgesamt wurden drei Würfe mit sieben K14-Cre/IKK2^{FL/FL} und 19 Kontroll Mäuse mit huTNFR:Fc behandelt. Ein Wurf (zwei K14-Cre/IKK2^{FL/FL} und acht Kontrollmäuse) wurde täglich (P1-P7) mit 20 µg/d humanem IgG behandelt. Über zehn Würfe von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} und Kontrollmäusen wurden unbehandelt analysiert. Die IgG behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse zeigen den Phänotyp und keinen Unterschied zu den unbehandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen. Dagegen zeigen die huTNFR:Fc behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-IgG behandelten und unbehandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen einen deutlich abgeschwächten Phänotyp. Makroskopisch ist bei den huTNFR:Fc behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen eine reduzierte Schuppung zu beobachten. Die Haut ist weniger verdickt und entzündet. Dies wird durch die Haematoxilin/Eosin-Färbung in Abbildung 3.11 bestätigt. Die Epidermis ist in den huTNFR:Fc behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen weitaus dünner und die Zellintensität in der Dermis erscheint geringer als in den Kontroll-IgG behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen. Insgesamt ist die Haut dünner und ihre Struktur gleicht der von normaler Haut.



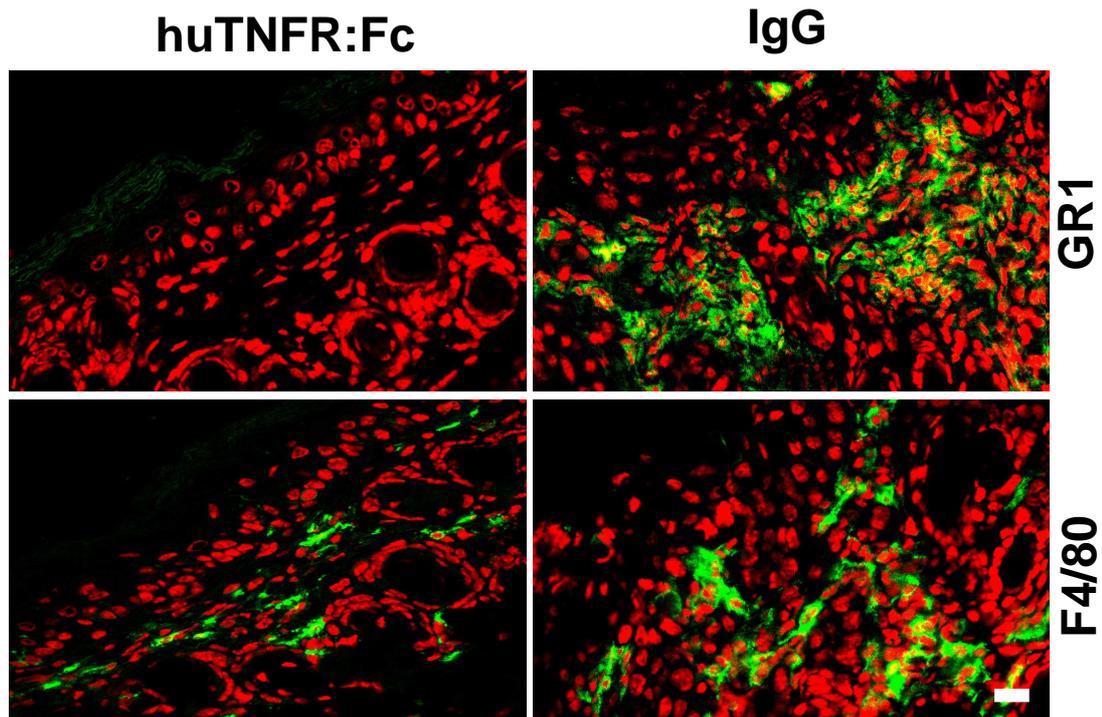


Abbildung 3.11: Abschwächung des entzündlichen Hautphänotyps von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen durch die Verabreichung von huTNFR:Fc.

Die lichtmikroskopischen Bilder zeigen Hautschnitte, die mit Haematoxylin/Eosin (H&E) angefärbt wurden. Die Immunfluoreszenz-Bilder stellen Hautschnitte dar, die mit Antikörpern gegen die epidermalen Differenzierungsmarker Keratin 14 (K14), Keratin 10 (K10) und Loricrin (Lor), sowie mit Antikörpern gegen CD3 positive T-Lymphozyten (CD3), Granulozyten (GR1) und Makrophagen (F4/80) gefärbt (grün) wurden. Linke Spalte: Schnitte von mit huTNFR:Fc behandelten Mäusen. Rechte Spalte: Schnitte von Kontrollmäusen. Die Gegenfärbung (rot) erfolgte mit Propidiumiodid. Skalierungsbalken: 40 µm.

Die immunhistologischen Untersuchungen zeigen, dass sich die Expression von Keratin 14 in den huTNFR:Fc behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen, im Gegensatz zu den IgG behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen, weitgehend auf die basale Schicht der Epidermis beschränkt. Die Marker für höhere Differenzierungsstadien Keratin 10 und Loricrin sind nach huTNFR:Fc-Behandlung, nicht jedoch nach IgG-Behandlung suprabasal nachweisbar. Das dermale Entzündungsinfiltrat zeigt eine reduzierte Einwanderung von T-Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen in die Haut der huTNFR:Fc behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse (Abbildung 3.11).

3.2.2 Untersuchung der Immunzellpopulationen in der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Vorherige histologische und immunhistologische Analysen der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen haben gezeigt, dass es in der Dermis zu einer Akkumulation von Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen kommt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese Immunzellen TNF exprimieren (Pasparakis et al., 2002). Deshalb wurden die einzelnen Immunzellpopulationen untersucht um zu überprüfen, inwieweit jede Population an der Entstehung des Phänotyps beteiligt ist.

3.2.3 Charakterisierung der Makrophagen in der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Vorangegangene Färbungen haben gezeigt, dass die in die Dermis von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen einwandernden Immunzellen größtenteils positiv für den Makrophagenmarker F4/80 sind (Abbildung 3.11, 3.6; Pasparakis et al., 2002). Diese F4/80 positiven Makrophagen akkumulieren oft direkt an der Grenze zwischen Dermis und Epidermis (Abbildung 3.12a und b).

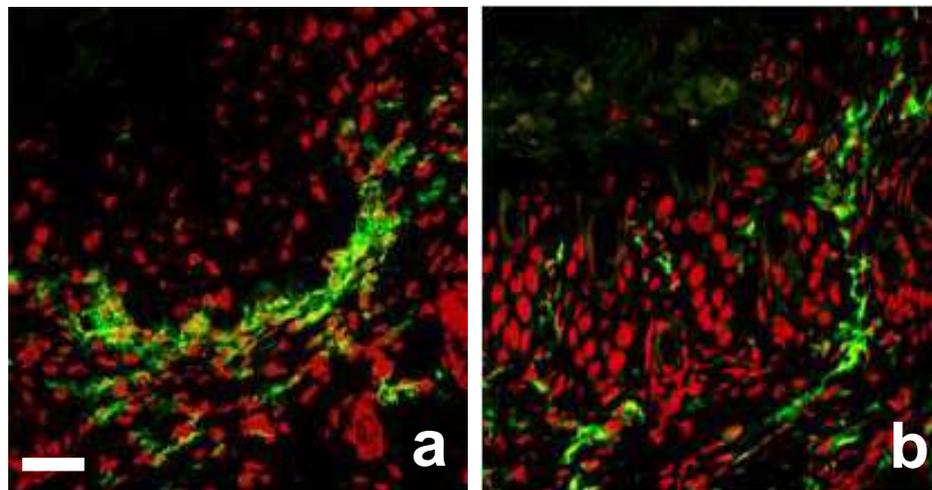
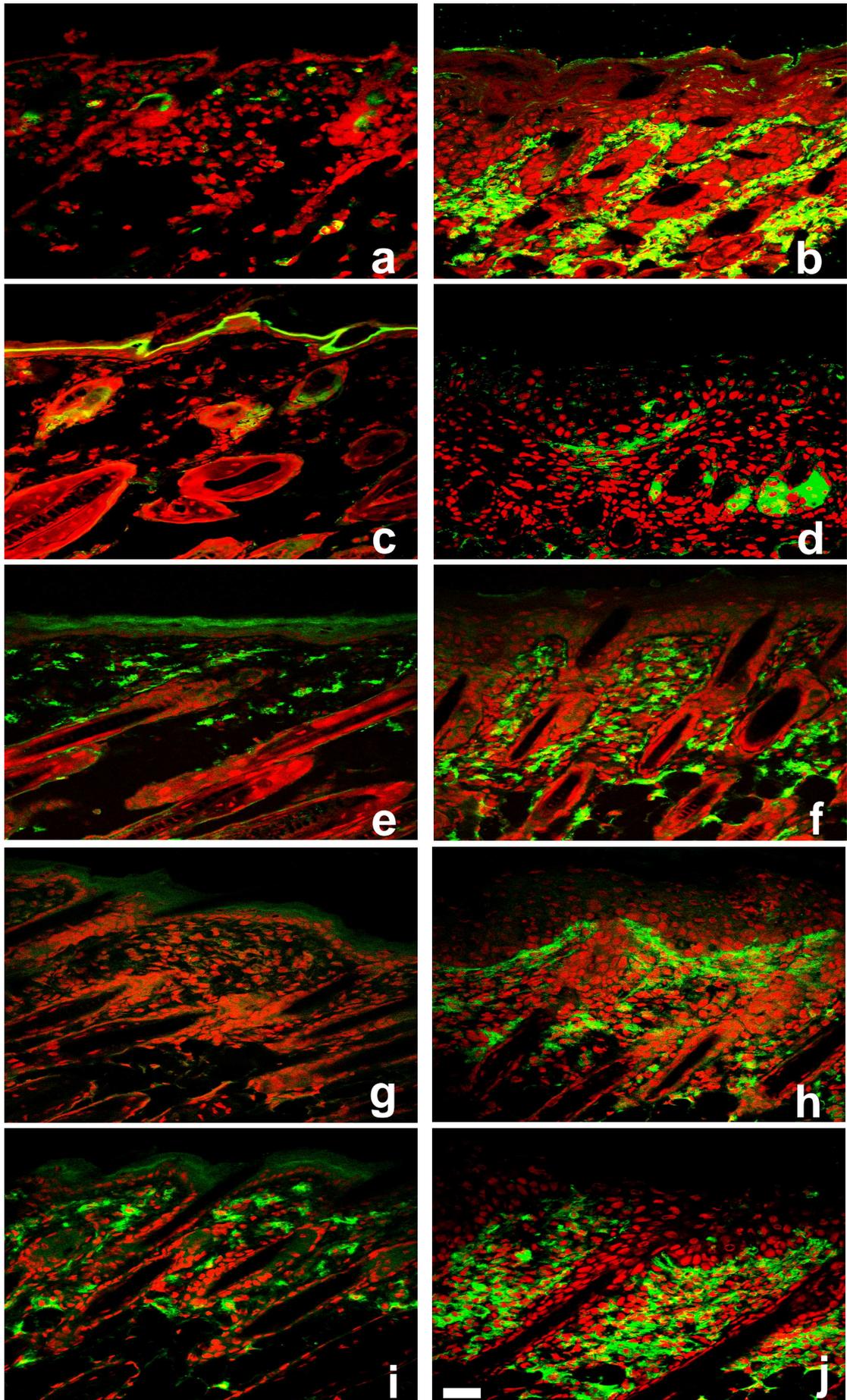


Abbildung 3.12: Akkumulierte Makrophagen zwischen Dermis und Epidermis.

In den Schnitten aus der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen wurden die Makrophagen mit F4/80 angefärbt (grün). Abbildung **a** zeigt F4/80 positive Makrophagen in vier Tage alten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen im Entstehungs- und Entwicklungsstadium des Phänotyps und Abbildung **b** nach sieben Tagen im Endstadium des Phänotyps. Die Hautschnitte wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt (rot). Skalierungsbalken: 40 µm.

Diese im Bereich der Junktionszone zwischen Dermis und Epidermis akkumulierten Makrophagen erinnern an eine bereits früher beschriebene Population von "epithelium-lining macrophages" in der Haut des Menschen. Diese Formation von Makrophagen wurde in psoriatischer Haut, aber auch bei anderen entzündlichen Hauterkrankungen beobachtet und beschrieben (van den Oord et al., 1994; Boehncke et al., 1995). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass das entzündliche Infiltrat in psoriatischer Haut sowohl klassisch aktivierte als auch alternativ aktivierte Makrophagen enthält (Nickoloff, 2000). Um diesen Teil des entzündlichen Infiltrats näher zu charakterisieren, wurden immunhistologische Färbungen an Hautschnitten von drei K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen und drei Kontrollmäusen durchgeführt. Gefärbt wurde mit Antikörpern gegen CD11b, CD14, CD16/32, CD206 (Mannose Rezeptor), CD83 und CD80. Die Makrophagen in der Dermis von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen färbten sich positiv mit Antikörpern gegen CD11b, CD206 und CD16/32 (Abbildung 3.13a und b, e und f, i und j). Die Expression von CD14 war im Infiltrat positiv, und auf Zellen beschränkt, die eine Makrophagen-typische Morphologie aufwiesen. Sie bildeten teilweise eine Linie entlang der Grenze von Dermis zu Epidermis (Abbildung 3.13d und e), ähnlich den „epithelium lining macrophages“ in menschlicher Haut (van den Oord et al., 1994; Boehncke et al., 1995). Diese Makrophagen färbten sich verstärkt mit dem Antikörper gegen CD83 an (Abbildung 3.13g und h). CD83 ist in Makrophagen zytoplasmatisch vorhanden und wird offenbar während ihrer Reifung zu dendritischen Zellen an die Membranoberfläche transportiert (Cao et al., 2005). CD80 wurde nur von einigen Zellen in der unteren Dermis exprimiert. Diese Zellen waren gleichzeitig positiv für CD83. Die für CD80 (rot) und CD83 (grün) positiven Zellen erscheinen in Abbildung 3.13k gelb.



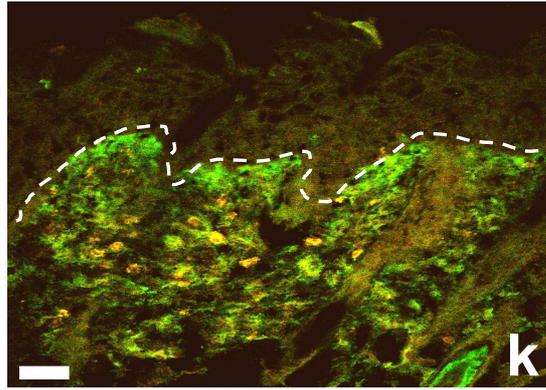


Abbildung 3.13: Charakterisierung der Makrophagen in der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen.

Immunhistologische Färbung der Hautschnitte von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen (grün), mit Antikörpern gegen CD11 (a und b), CD14 (c und d), CD206 (e und f), CD83 (g und h) und CD16/32 (i und j). Der Antikörper CD14 färbt in den Hautschnitten c und d die Talgdrüsen unspezifisch an. Die Hautschnitte (a-j) wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt (rot). Die Abbildung k zeigt eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CD83 (grün) und CD80 (rot). Skalierungsbalken: 40 μ m.

3.2.4 Depletion der Makrophagen in der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen durch die Injektion von Clodronat-Liposomen

Der Nachweis der Akkumulation aktivierter Makrophagen in der Dermis wirft die Frage auf, ob die massive Einwanderung der Makrophagen in die Dermis eine Rolle bei der Entstehung des Phänotyps spielt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Anzahl der Makrophagen in der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen durch die subkutane Verabreichung von Clodronat-Liposomen reduziert. Zwölf K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen aus sechs verschiedenen Würfen wurde Clodronat-Liposomen subkutan in den Nacken injiziert. Zur Kontrolle wurden auf dieselbe Weise sieben K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen Liposomen injiziert, die anstelle des Clodronats PBS enthielten (Kontroll-Liposomen). Die Behandlung der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit Clodronat-Liposomen bzw. mit Kontroll-Liposomen erfolgte nach den ersten makroskopischen Anzeichen des Phänotyps (P4). Die mit Kontroll-Liposomen behandelten Tiere zeigen makroskopisch keine Veränderung des Phänotyps. Die mit Clodronat-Liposomen behandelten Tiere zeigen dagegen eine deutliche Abschwächung des Phänotyps mit einer reduzierten Schuppenbildung (Abbildung 3.14).

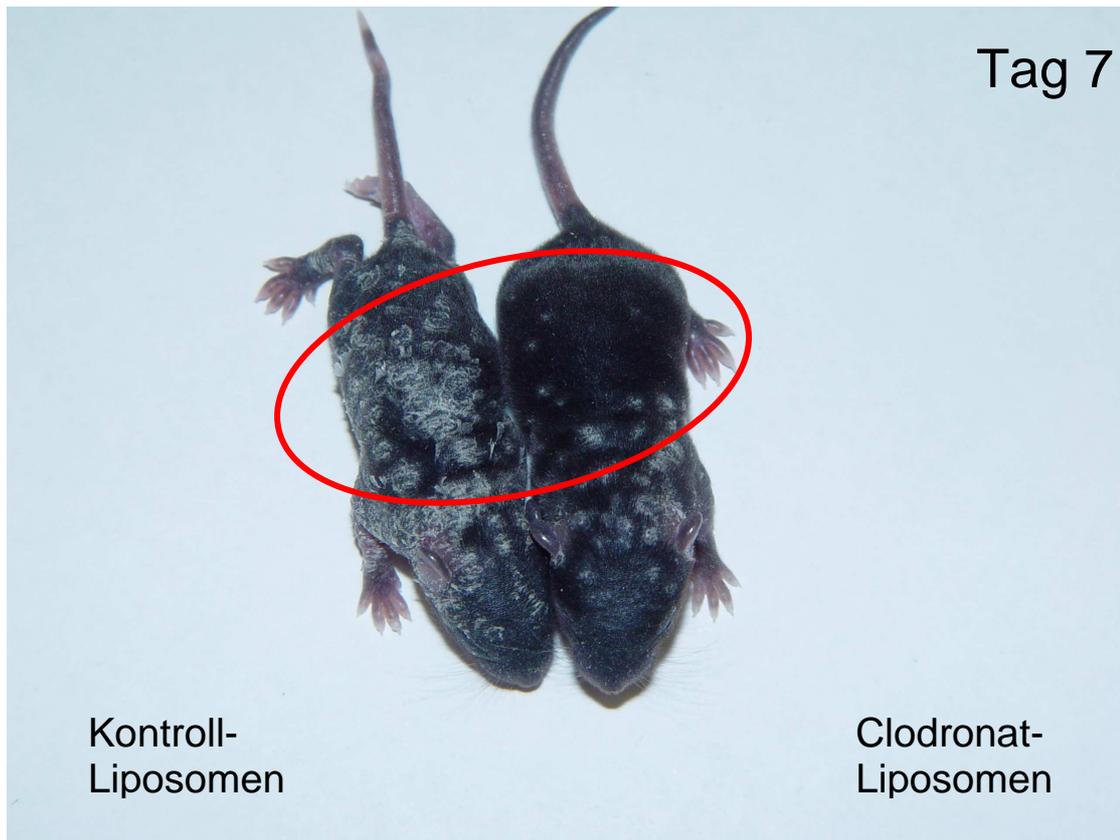


Abbildung 3.14: Foto von zwei $K14\text{-Cre/IKK2}^{FL/FL}$ Mäusen 7 Tage nach ihrer Geburt.

Das Kontrolltier links (Kontroll-Liposomen behandelte Maus) zeigt makroskopisch alle Merkmale des schuppig entzündlichen Phänotyps. Das rechte Tier (Clodronat-Liposomen behandelte Maus) zeigt makroskopisch einen deutlich verminderten Phänotyp mit einer reduzierten Schuppenbildung.

Am Tag 7-8 (P7-P8) wurden die Tiere getötet und näher untersucht. Die Behandlung der $K14\text{-Cre/IKK2}^{FL/FL}$ Mäuse mit Clodronat-Liposomen führt im Vergleich zu den mit Kontroll-Liposomen behandelten $K14\text{-Cre/IKK2}^{FL/FL}$ Mäusen zu einer drastischen Reduzierung der Makrophagenzahl in der Dermis. Die Färbung mit F4/80 zeigt, dass die Anzahl der Makrophagen in den injizierten Bereichen mit der Anzahl der Makrophagen in der Haut von Kontrollmäusen vergleichbar ist (Abbildung 3.15 mittlere Reihe).

Mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass mit Clodronat-Liposom behandelte $K14\text{-Cre/IKK2}^{FL/FL}$ Mäuse nur einen sehr schwachen hyperproliferativen, entzündlichen Hautphänotyp aufweisen. Die Epidermis ist im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen nur leicht verdickt.

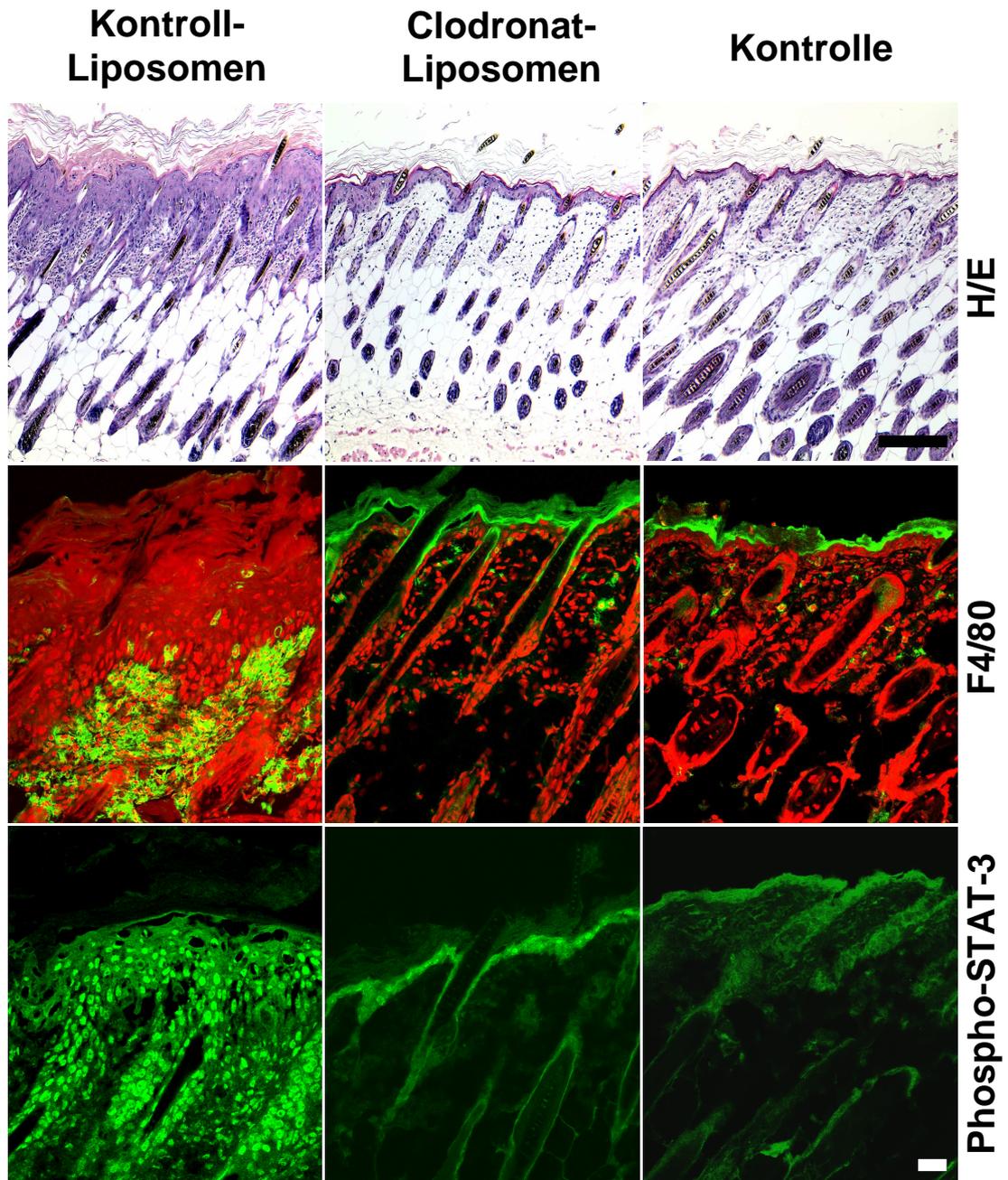
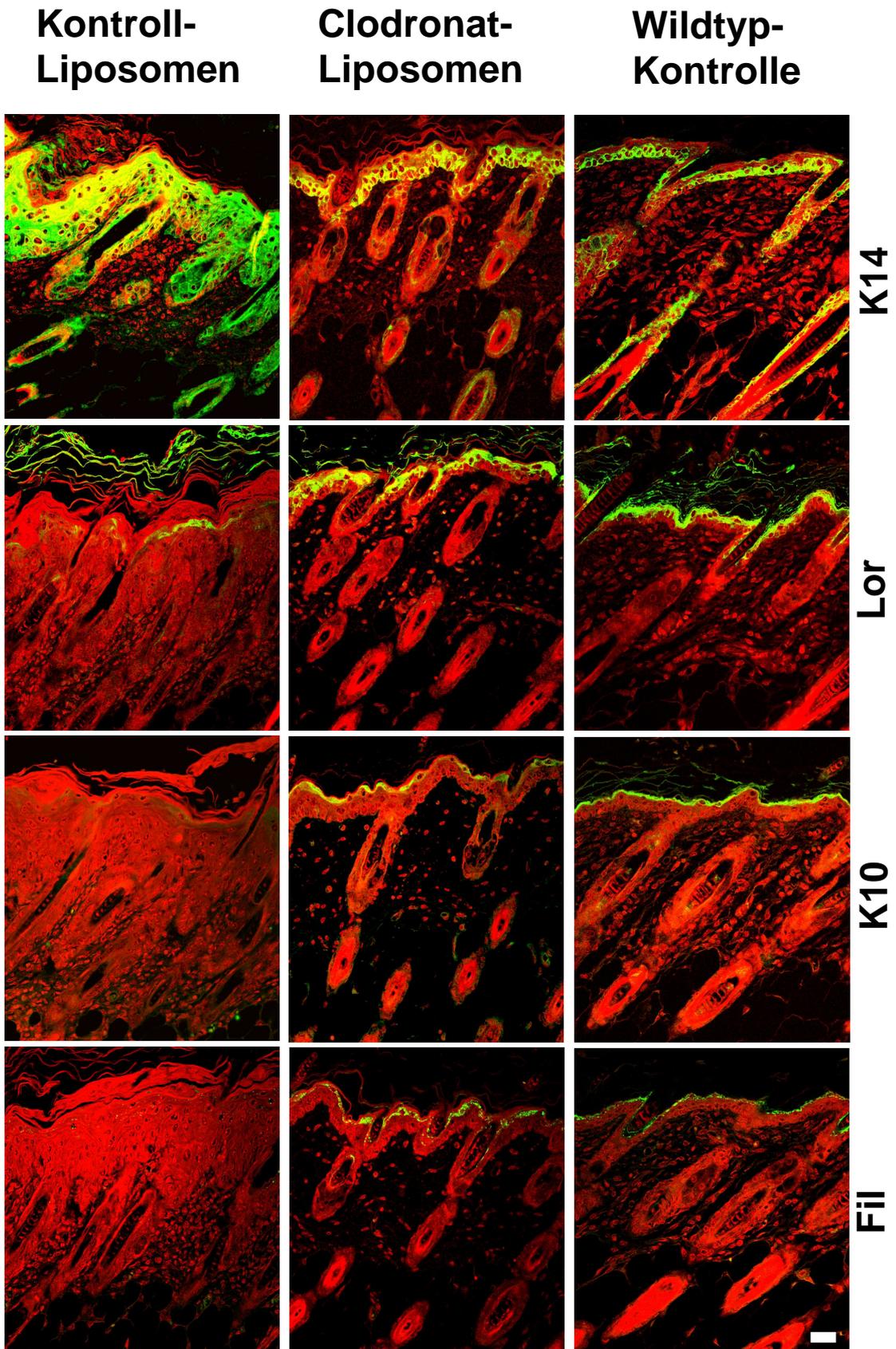


Abbildung 3.15: Abschwächung des entzündlichen Phänotyps durch die Behandlung von $K14\text{-Cre/IKK2}^{\text{FL/FL}}$ Mäusen mit Clodronat-Liposomen.

Die **linke Spalte** zeigt Hautschnitte von $K14\text{-Cre/IKK2}^{\text{FL/FL}}$ Mäusen die mit Kontroll-Liposomen behandelt wurden. Die **mittlere Spalte** zeigt die mit Clodronat-Liposomen behandelten $K14\text{-Cre/IKK2}^{\text{FL/FL}}$ Mäuse und die **rechte Spalte** unbehandelte Wildtypmäuse. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen in der **oberen Reihe** sind von Hautschnitten, die mit Haematoxylin/Eosin (H&E) angefärbt wurden. Die **mittlere und untere Reihe** zeigen immunhistologische Färbungen gegen Makrophagen (F4/80) und phosphoryliertes STAT3 (Phospho-STAT3) (grün). Die F4/80 Färbungen wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt (rot). Skalierungsbalken: 100 μm (H/E); 40 μm (Immunhistologische Färbungen).

Akanthose und Hyperkeratose sind stark vermindert. Eine Parakeratose fehlt und das Stratum granulosum ist deutlich sichtbar (Abbildung 3.15 obere Reihe). Die Dichte des Zellinfiltrats in der Dermis ist weitaus geringer als in den mit Kontroll-Liposomen behandelten Mäusen. Immunohistologische Färbungen von STAT3 zeigen, dass in den mit Kontroll-Liposomen behandelten Mäusen eine hohe Expression von phosphoryliertem STAT3 nachweisbar ist. Dagegen ist die Phosphorylierung von STAT3 in den mit Clodronat-Liposomen behandelten Tieren sehr viel geringer und zeigt die gleiche Expression wie die Wildtypkontrolle (Abbildung 3.15 untere Reihe). Auch die Hautbereiche, in die nicht direkt Clodronat-Liposomen injiziert wurden, zeigen makroskopisch und mikroskopisch einen mildereren Phänotyp. Dieser ist jedoch nicht so stark reduziert wie in den direkt behandelten Arealen. Um näher zu charakterisieren, inwieweit die Behandlung mit Clodronat-Liposomen die gestörte terminale Differenzierung der Keratinozyten in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen verändert, wurden Hautschnitte mit den spezifischen Differenzierungsmarkern Keratin 14, Keratin 10, Loricrin und Filaggrin gefärbt (Abbildung 3.16). Die immunohistologischen Färbungen in Abbildung 3.16 zeigen, dass in mit Clodronat-Liposomen behandelten Mäusen Keratin 14 nicht mehr so stark in den suprabasalen Schichten exprimiert wird. Die mit Clodronat-Liposomen behandelten Tiere zeigen im Gegensatz zu den mit Kontroll-Liposomen behandelten Tieren eine Expression der Differenzierungsmarker Keratin 10, Loricrin und Filaggrin. Um zu untersuchen, welche Auswirkung die Depletion der Makrophagen auf die anderen Immunzellpopulationen im entzündlichen Infiltrat der Dermis hat, wurden die Hautschnitte mit Antikörpern gegen GR1 und CD3 gefärbt (Abbildung 3.16). Die Färbungen zeigen, dass auch die Anzahl der Granulozyten sowie der T-Lymphozyten in den mit Clodronat-Liposomen behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen drastisch zurückgegangen ist im Vergleich zu den mit Kontroll-Liposomen behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen (Abbildung 3.16). Das lässt den Schluss zu, dass Makrophagen in der Dermis vorhanden sein müssen, damit Granulozyten und T-Lymphozyten in die Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen einwandern.



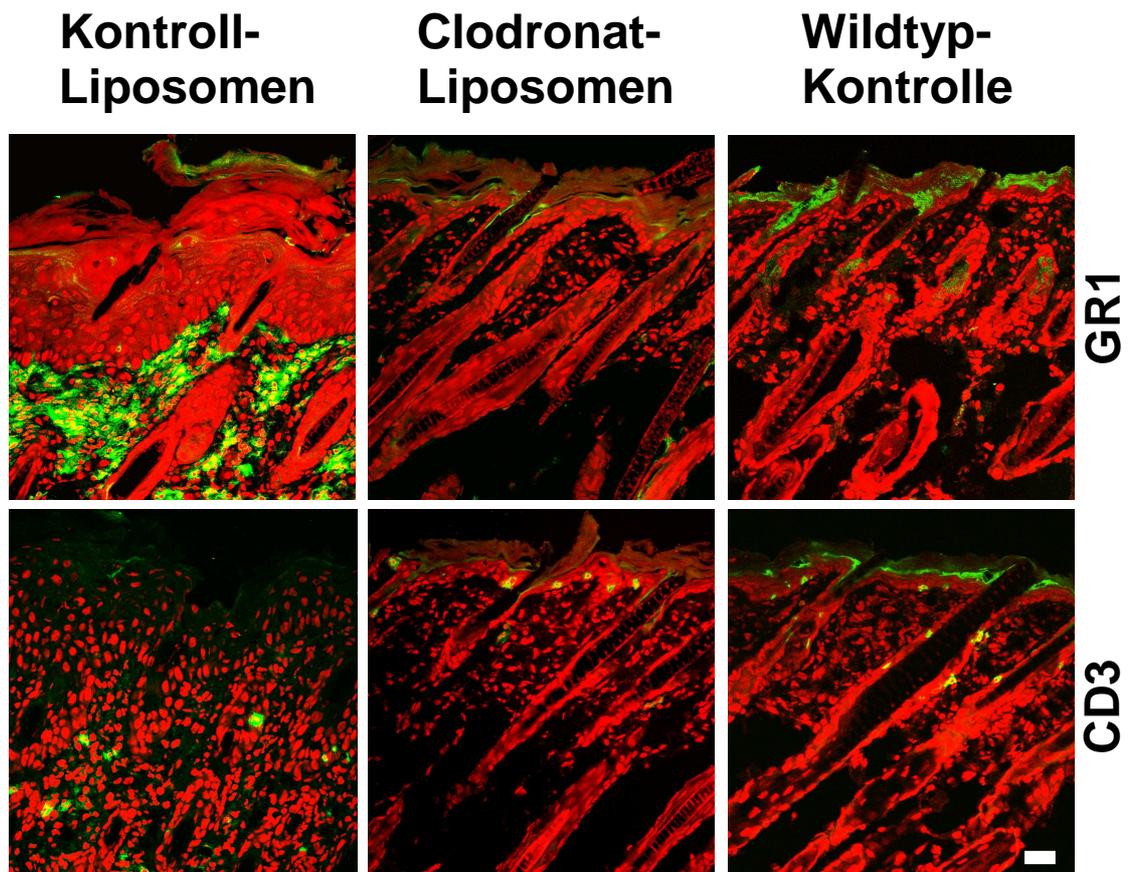


Abbildung 3.16: Die Behandlung mit Clodronat-Liposomen normalisiert die epidermale Differenzierung und verhindert die Einwanderung von Granulozyten und CD3 positiven T-Lymphozyten in die Dermis von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen.

Darstellung immunhistologischer Färbungen von Hautschnitten mit Antikörpern gegen die epidermalen Differenzierungsmarker Keratin 14 (K14), Keratin 10 (K10), Loricrin (Lor) und Filaggrin (Fil), sowie gegen Oberflächenmarker von Granulozyten (GR1) und T-Lymphozyten (CD3). Grün: Oberflächenmarker; Rot: Propidiumjodid. Die Hautproben wurden am Tag sieben nach der Geburt von mit Kontroll-Liposomen behandelten (linke Spalte) und Clodronat-Liposomen behandelten (mittlere Spalte) K14-Cre-IKK2^{FL/FL} Mäusen sowie von unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (rechte Spalte) entnommen. Skalierungsbalken: 40 µm.

Aufgrund der Tatsache, dass die Elimination der Makrophagen sowohl die Akkumulation der Granulozyten und T-Lymphozyten verhindert, als auch den Phänotyp stark abschwächt, muss untersucht werden, ob der abgeschwächte Verlauf der Hauterkrankung der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse durch die Clodronat-Liposomen eine direkte Konsequenz der Makrophagendepletion darstellt oder das Ergebnis der gehemmten Migration und Akkumulation von Granulozyten und T-Lymphozyten in der Haut ist. Da bereits in Pasparakis et al., 2002 ausgeschlossen wurde, dass T-Lymphozyten eine pathogene Rolle in den

K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen spielen, wurden in dieser Arbeit die Granulozyten untersucht.

3.2.5 Erhöhte Anzahl von unreifen Granulozyten in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Bei der näheren Untersuchung der Granulozyten durch das Auszählen der weißen Blutkörperchen auf Blutaussstrichen zeigt sich, dass es zu einer massiven Mobilisierung von Granulozyten aus dem Knochenmark in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen kommt.

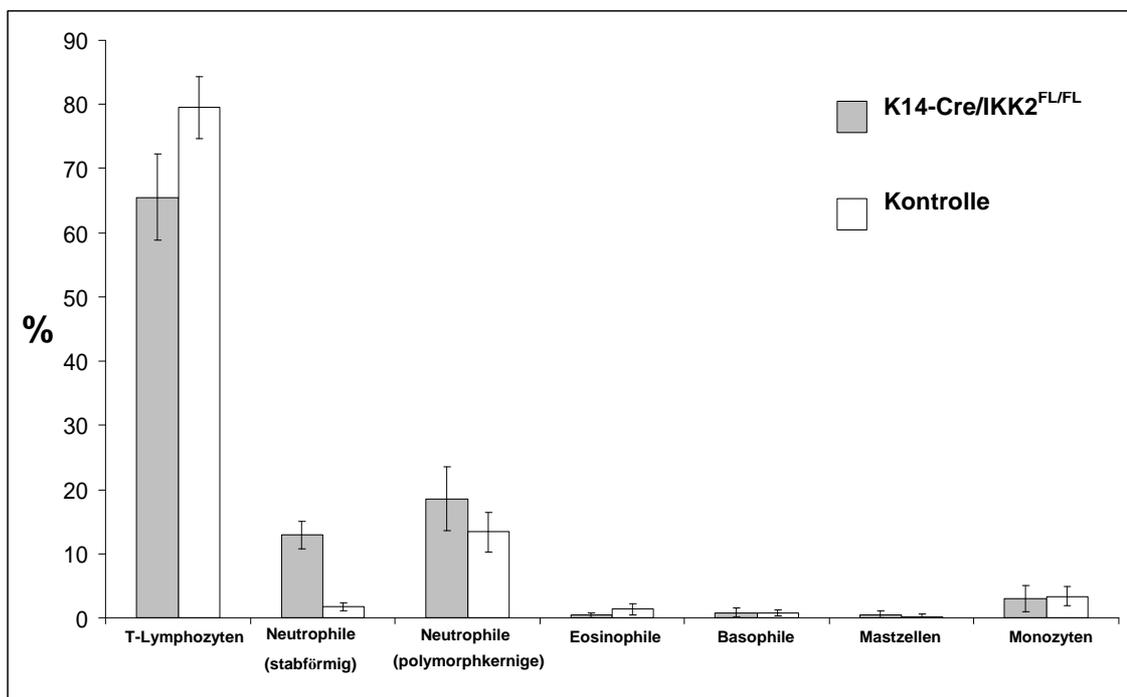


Abbildung 3.17: Linksverschiebung der Neutrophilen im Blut von sieben Tage alten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen.

Die weißen Blutkörperchen wurden auf Blutaussstrichen von drei K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen und zwei Kontrollmäusen gezählt. Es zeigt sich eine relative Erhöhung der Anzahl von Neutrophilen (stabförmige und polymorphkernige) und ein relativer Rückgang der Anzahl von T-Lymphozyten.

Die Auswertung zeigt eine erhöhte Anzahl von im Blut zirkulierenden Granulozyten mit einem relativen Anstieg von stabförmigen Zellen (Linksverschiebung: Bezeichnung für eine relative Erhöhung von unreifen

Neutrophilen in einer Entzündung) in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen verglichen mit den Kontrollen (Abbildung 3.17).

3.2.6 Hemmung der Migration der Granulozyten in die Dermis von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen durch gezielte Deletion von CD18

Um zu klären, wie essentiell oder nicht essentiell die Population der Granulozyten für die Entstehung des Phänotyps in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen ist, wurde die Migration der Granulozyten in die Dermis gehemmt. Dazu wurden K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit CD18-defizienten Mäusen (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-}) gekreuzt. CD18 ist eine β_2 -Integrin Untereinheit auf Leukozyten. Das Fehlen der β_2 -Integrin Untereinheit hat zur Folge, dass die Granulozyten nicht mehr in der Lage sind, aus den Blutgefäßen in die Dermis einzuwandern (Scharffetter-Kochanek et al., 1998). Die histochemische Überprüfung mit einer Chloracetat-Esterase Färbung zeigt, dass es in homozygoten K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} Mäusen zu einem Fehlen von Granulozyten in der Haut kommt (Abbildung 3.18b). In den heterozygoten K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{+/-} Mäusen dagegen kommt es weiterhin zu einer massiven Migration der Granulozyten in die Dermis (Abbildung 3.18a). Das Ergebnis wird durch die Auszählung der Granulozyten (Abbildung 3.18c) bestätigt. Dafür wurden Hautschnitte von sechs K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} und sechs K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{+/-} oder K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen ausgezählt. Die Auswertung bestätigt, dass in dem K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} Mausmodell nahezu keine Granulozyten mehr in die Dermis einwandern. Die K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} Mäuse entwickeln den gleichen Hautphänotyp wie die K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse.

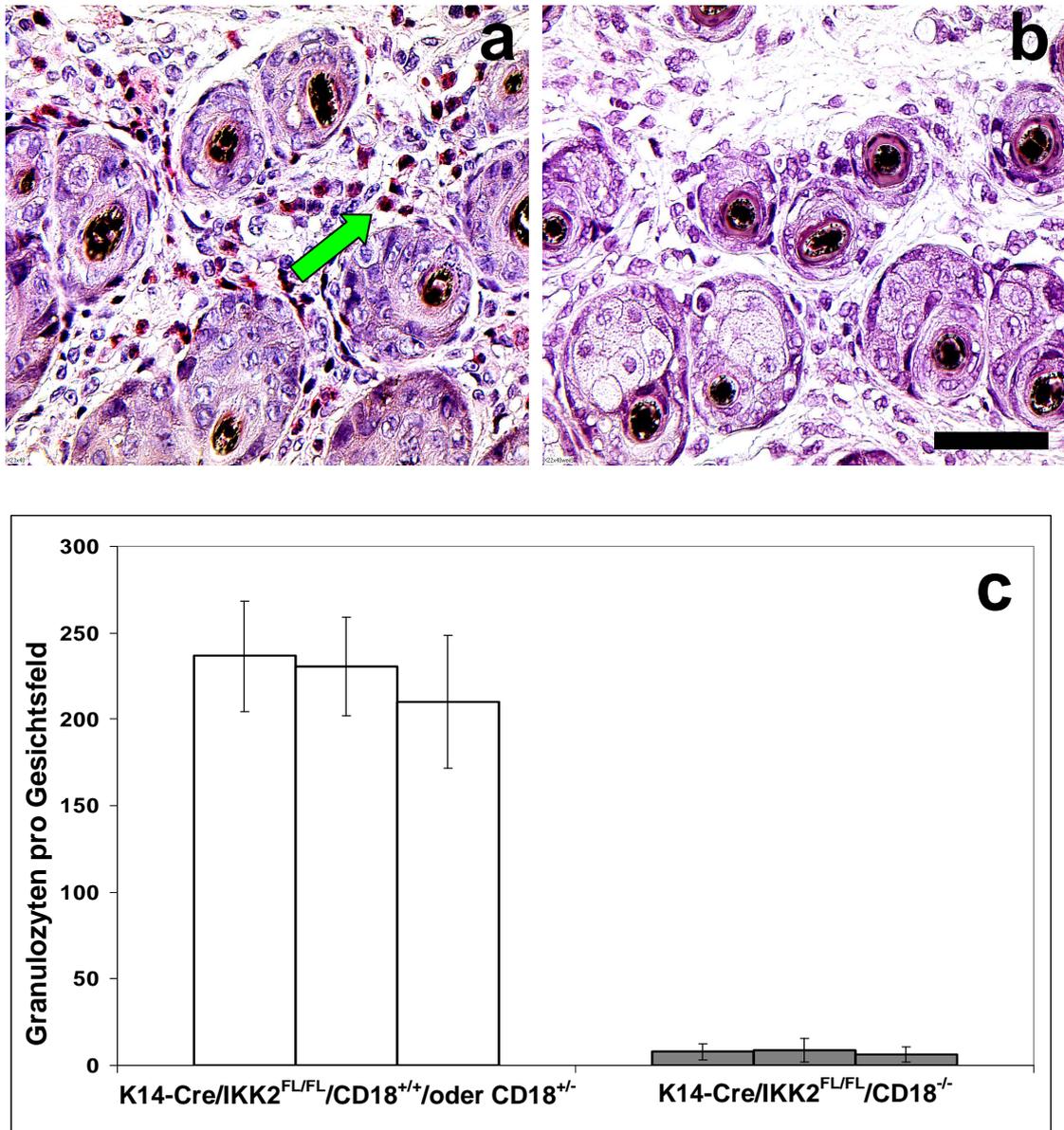


Abbildung 3.18: Die gezielte Deletion von CD18 verhindert die Migration von Granulozyten in die Dermis der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse.

Die Abbildungen **a** und **b** zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen von histochemischen Färbungen für Chloracetat-Esterase aus Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{+/-} (**a**) und Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} Mäusen (**b**). Chloracetat-Esterase positive Granulozyten sind dunkelrot (grüner Pfeil). Skalierungsbalken: 50 µm. Abbildung **c** stellt die Resultate der Auszählung der Chloracetat-Esterase positiven Granulozyten in der Haut von sechs Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} und sechs Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{+/-} oder CD18^{+/+} Mäusen dar. Es wurden 10 Gesichtsfelder pro Maus ausgezählt. Jeder Balken zeigt die durchschnittliche Anzahl der Granulozyten pro Gesichtsfeld von je 2 Mäusen.

Die histologische und immunhistologische Untersuchung der Hautschnitte von acht K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} Mäusen zeigt, dass trotz einer inhibierten Einwanderung der Granulozyten in die Dermis die Erscheinungsform des Phänotyps erhalten bleibt (Abbildung 3.19).

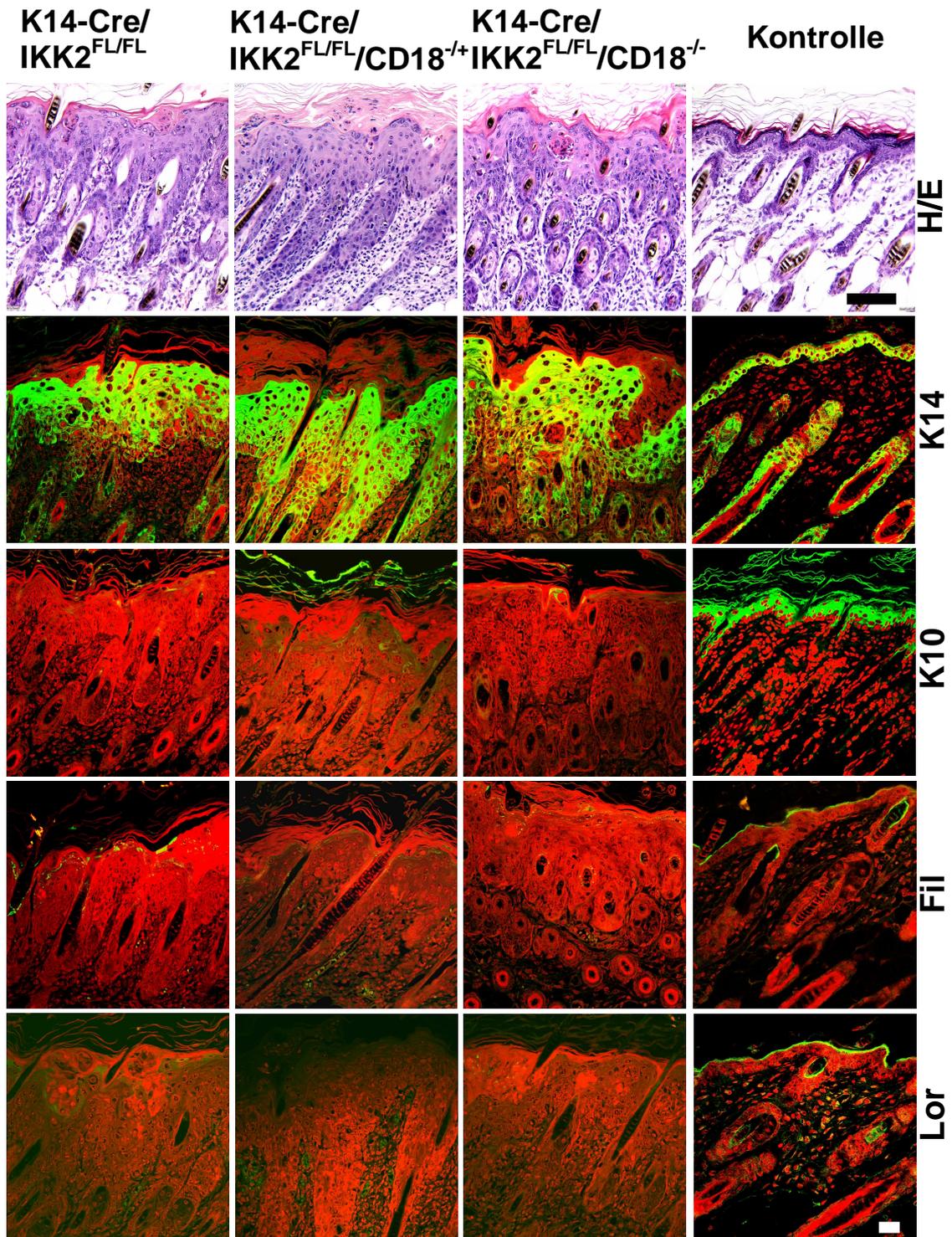


Abbildung 3.19: Die Elimination der Granulozyten aus der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen verhindert nicht die Entstehung des Phänotyps.

Die Tiere wurden am P7 für histologische und immunhistologische Untersuchungen getötet. Die obere Reihe zeigt Haematoxylin/Eosin (H/E) gefärbte Hautschnitte von K14-Cre/IKK2^{FL/FL}-, Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{+/-}-, Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} und Kontrollmäusen (Spalten von links nach rechts). Die Hautschnitte der unteren Reihen wurden immunhistologisch mit Antikörpern gegen die epidermalen Differenzierungsmarker K14, K10, Filaggrin und Loricrin gefärbt (grün). Die Schnitte wurden mit Propidiumiodid gegengefärbt (rot), um die Hautstruktur erkennbar zu machen. Skalierungsbalken 100 µm (H/E); 40 µm (Immunhistologische Färbungen).

Auch die $\text{Cre/IKK2}^{\text{FL/FL}}/\text{CD18}^{-/-}$ Mäuse zeigen wie die $\text{K14-Cre/IKK2}^{\text{FL/FL}}$ Mäuse eine stark verdickte Epidermis mit einer deutlich ausgeprägten Hyper- und Parakeratose und einem Verlust des Stratum granulosum (Abbildung 3.19 obere Reihe).

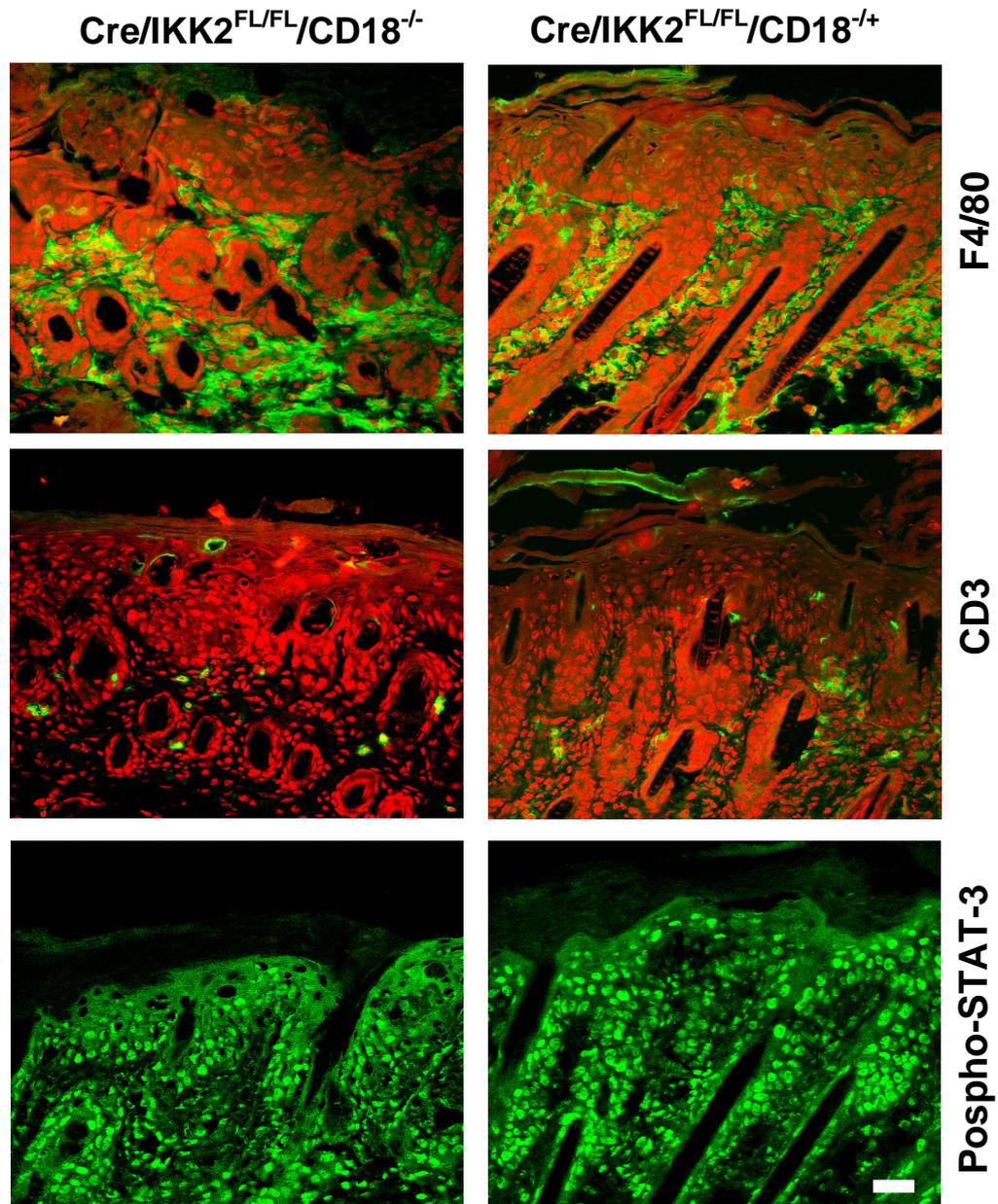


Abbildung 3.20: Die Elimination der Granulozyten aus der Haut von $\text{K14-Cre/IKK2}^{\text{FL/FL}}$ Mäusen unterdrückt die Entzündung nicht.

Die Hautschnitte von $\text{Cre/IKK2}^{\text{FL/FL}}/\text{CD18}^{-/-}$ - und $\text{K14 Cre IKK2}^{\text{FL/FL}}/\text{CD18}^{+/+}$ Mäusen wurden immunhistologisch gegen die Marker F4/80, CD3 und Phospho-STAT3 gefärbt (grün). Die Hautstruktur wurde durch die Gegenfärbung mit Propidiumiodid visualisiert (rot). Skalierungsbalken: 40 μm .

Die Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} Mäuse zeigen, ähnlich wie die K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse, eine Störung in der Differenzierung der Keratinozyten. Die Expression von Keratin 14 erstreckt sich weiterhin über alle epidermalen Schichten. Auch ist die Expression der terminalen Differenzierungsmarker Keratin 10, Loricrin und Filaggrin gestört bzw. nicht vorhanden (Abbildung 3.19).

Um herauszufinden, welchen Einfluss das Fehlen von Granulozyten in der Dermis auf andere Immunzellpopulationen hat, wurden Hautschnitte von Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} Mäusen und Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{+/-} Mäusen als Kontrolle mit Antikörpern gegen Makrophagen (F4/80) und CD3-positive T-Lymphozyten angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen und CD3-positive T-Lymphozyten auch ohne die Anwesenheit der Granulozyten in gleicher Anzahl und Dichte in der Dermis vorhanden sind (Abbildung 3.20). Zusätzlich wurde phosphoryliertes STAT3 angefärbt. Auch dieser Marker zeigt in den Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} Mäusen keine Unterschiede zu den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen.

3.2.7 Effekt von Clodronat-Liposomen auf Mastzellen in der Dermis von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Um festzustellen, in welchem Zusammenhang ein Anstieg der Mastzellen in der Haut mit der Entwicklung des Phänotyps der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse steht, wurden Untersuchungen an dieser Zellpopulation durchgeführt. Dafür wurde die Anzahl der Mastzellen in der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen und Kontrollmäusen ab dem Zeitpunkt der Geburt bis zum Tag fünf verglichen. An den Tagen P1-P3 sind keine relevanten Unterschiede in den Zellzahlen bei K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen und Kontrollmäusen zu erkennen. An Tag P4 kommt es bei K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen zu einem leichten Anstieg der Mastzellen gegenüber den Kontrollmäusen. An Tag P5 zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Mastzellen in der Haut der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse.

Um zu zeigen, welchen Effekt die Behandlung mit Clodronat-Liposomen auf die Mastzellen hat, wurden diese in der Haut von sieben Clodronat- und sechs Kontroll-Liposomen behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen, sowie von fünf unbehandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL}- und fünf Cre negativen IKK2^{FL/FL}- oder IKK2^{FL/+} Mäusen ausgezählt. Es wurden zehn Gesichtsfelder pro Maus betrachtet. Die Daten in Abbildung 3.21 legen nahe, dass die Mastzellen durch

die Clodronat-Liposomen nicht depletiert werden. In den Clodronat-Liposomen behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen sind weiterhin Mastzellen vorhanden. Ihre Anzahl hat sich jedoch im Vergleich zu den unbehandelten und Kontroll-Liposomen behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen auf das Niveau der Kontrollen reduziert. Es gibt eine Korrelation der Anzahl der dermalen Mastzellen mit der Stärke des Phänotyps. Die Zahl der Mastzellen steigt erst stark an, nachdem der Phänotyp sich bereits ausgebildet hat. Das lässt nicht auf eine kausale Rolle der Mastzellen in der Pathogenese des entzündlichen Hautphänotyps schließen.

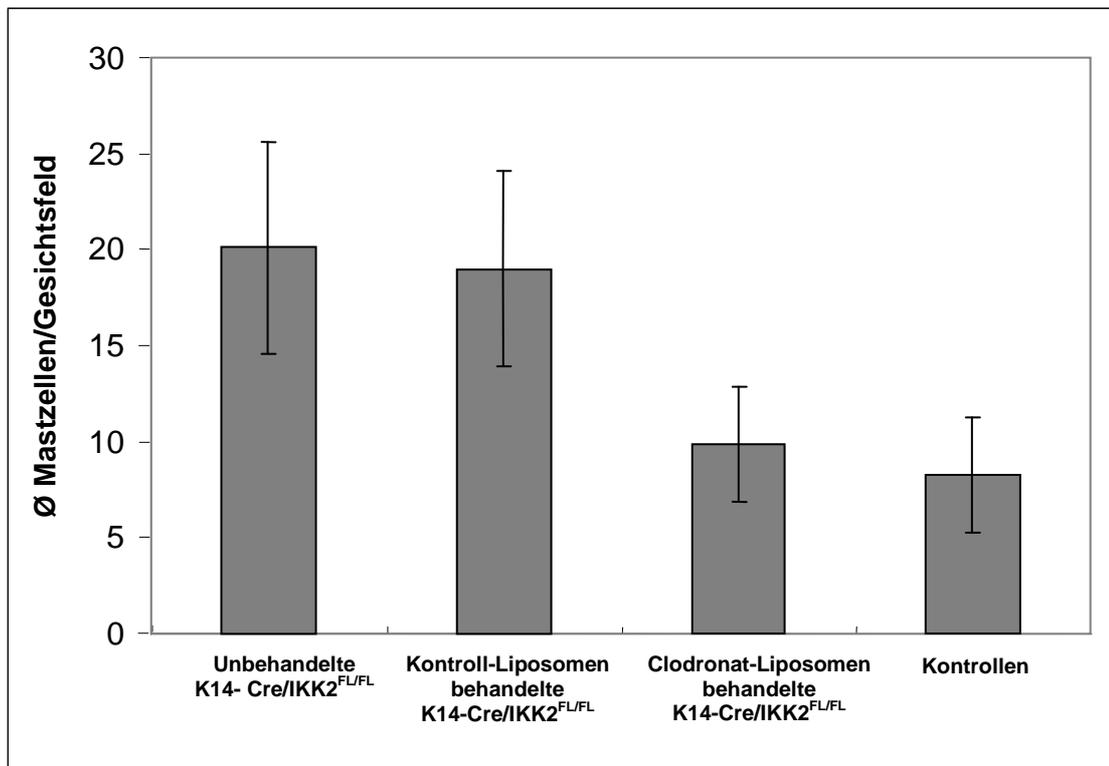


Abbildung 3.21: Effekt von Clodronat-Liposomen auf Mastzellen in der Dermis von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen.

In der Abbildung wird die durchschnittliche Mastzellzahl pro Gesichtsfeld in der Dermis von unbehandelten, Kontroll-Liposomen behandelten und Clodronat-Liposomen behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen, sowie die Mastzellzahl von Kontrollmäusen dargestellt. Es wurden zehn Gesichtsfelder pro Maus ausgewertet. Es wurden fünf unbehandelte, sechs mit Kontroll-Liposomen und sieben mit Clodronat-Liposomen behandelte K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse, sowie fünf Cre-negative IKK2^{FL/FL} oder IKK2^{FL/+} Mäuse (Kontrollen) ausgezählt.

3.2.8 Affymetrix Genexpressions-Analyse der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen zeigt eine verstärkte Expression von IFN- γ regulierten Proteinen

Die Ergebnisse zeigen, dass Makrophagen für die Entstehung des Phänotyps in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen notwendig sind. Es stellte sich die Frage, ob und

welche frühen Faktoren und Umstände für die Akkumulation der Makrophagen in der Haut und die Entwicklung des Phänotyps relevant sein könnten. Um dies zu untersuchen, wurde eine Genexpressions-Analyse der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL}- und Kontrollmäusen durchgeführt. Dafür wurde RNA aus der Haut von je einer K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Maus und je einer Kontrollmaus an den Tagen zwei und drei nach der Geburt isoliert. Die Genexpressions-Daten der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Maus wurden mit den Genexpressions-Daten der für den Tag entsprechenden Kontrollmaus verglichen. Daraus ergibt sich eine Liste mit den Genen, die in der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Maus gegenüber der Kontrolle hoch- oder runterreguliert wurden (Tabelle 1).

Tabelle 3.1: Ergebnis der Affymetrix Gen-Chip Analyse.

IFN- γ -induzierbare Proteine	Expressions-Unterschied P2	Expressions-Unterschied P3
IIGP	5,3	17,1
IGTP	0	4,6
GTPI	0	5,3
IFN-activated gene 202	0	17,1
IFN-activated gene 204	0	4,3
IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	0	30
IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	0	15
TGTP	2,6	78,8
MG11	0	5,6
LRG-47	0	12,1
IFN-induced 15-kDa protein	0	3
IRF-1	0	2,1
IFN-dependent positive acting transcription factor 3 γ	0	2,1

Die mRNA Konzentration verschiedener Gene in der Haut von je einer K14-Cre/IKK2^{FL/FL}- und je einer Kontrollmaus gleichen Geschlechts aus demselben Wurf wurden an den Tagen P2 und P3 miteinander verglichen. Nur eine Veränderung von +/- Faktor 2 wurde als signifikante Veränderung gewertet. Die Werte in der Tabelle geben die „vielfach“ erhöhte Expressionsstärke der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse gegenüber den Kontrollmäusen wieder. IGTP (inducibly expressed GTPase; GTPI (IFN-inducible GTPase 2); TGTP (T-cell-specific GTP binding protein); MG11(IFN γ -inducible protein Mg11); LRG-47 (IFN-inducible p47GTPase); IRF-1(IFN regulatory factor-1).

Die Analyse der Daten zeigt, dass in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen verstärkt Gene exprimiert werden, die einer Regulation durch IFN- γ unterliegen (Tabelle

3.1). Die Expression dieser Gene steigt von P2 zu P3 teilweise stark an. Zum Beispiel wird die Expression von TGTP (T-cell-specific GTP binding Protein) am P3 in der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Maus verglichen mit der Kontrollmaus um das 78,8-fache erhöht.

3.2.9 Gezielte Deletion des IFN- γ -Rezeptors

Das Ergebnis der Genexpressionsanalyse weist darauf hin, dass in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen an P2 und P3 sehr früh IFN- γ vermittelte Signale vorhanden sind. IFN- γ ist neben TNF einer der Hauptstimulatoren bei der klassischen Aktivierung der Makrophagen (Mosser, 2003). Ebenfalls sind IFN- γ abhängige genregulatorische Signaltransduktionswege dafür bekannt, dass sie essenziell für die klassische Aktivierung der Makrophagen während des Anfangsstadiums einer Erkrankung sind (Mosser, 2003; Gattoni et al., 2006). Wie bereits beschrieben, konnte gezeigt werden, dass der entzündliche Hautphänotyp in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen von TNF- α und der Anwesenheit der Makrophagen in der Dermis abhängig ist. Daraus ergibt sich die Frage, ob IFN- γ -Rezeptor vermittelte Signale für die Entwicklung des Phänotyps notwendig sind. Hierfür wurden K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit IFN- γ -Rezeptor defizienten Mäusen (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/IFN- γ R^{-/-}) gekreuzt. Die gezielte Deletion des IFN- γ -Rezeptors verhindert nicht die Ausbildung des entzündlichen Phänotyps in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen. K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/IFN- γ R^{-/-} Mäuse entwickelten den gleichen Phänotyp wie K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse. Anders als bei K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen ist der Phänotyp bei K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/IFN- γ R^{-/-} Mäusen makroskopisch erst mit einer Verzögerung von zwei Tagen festzustellen. Von vier K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/IFN- γ R^{-/-} Mäusen wurden Hautproben entnommen und histologische und immunhistologische Färbungen mit Antikörpern gegen Differenzierungsmarker der Epidermis (K14, K10, Lor und Fil) und gegen Makrophagen (F4/80) durchgeführt. Die Färbungen zeigen keine Unterschiede im Phänotyp zwischen K14-Cre/IKK2^{FL/FL}- und K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/IFN- γ R^{-/-} Mäusen (Abbildung 3.22).

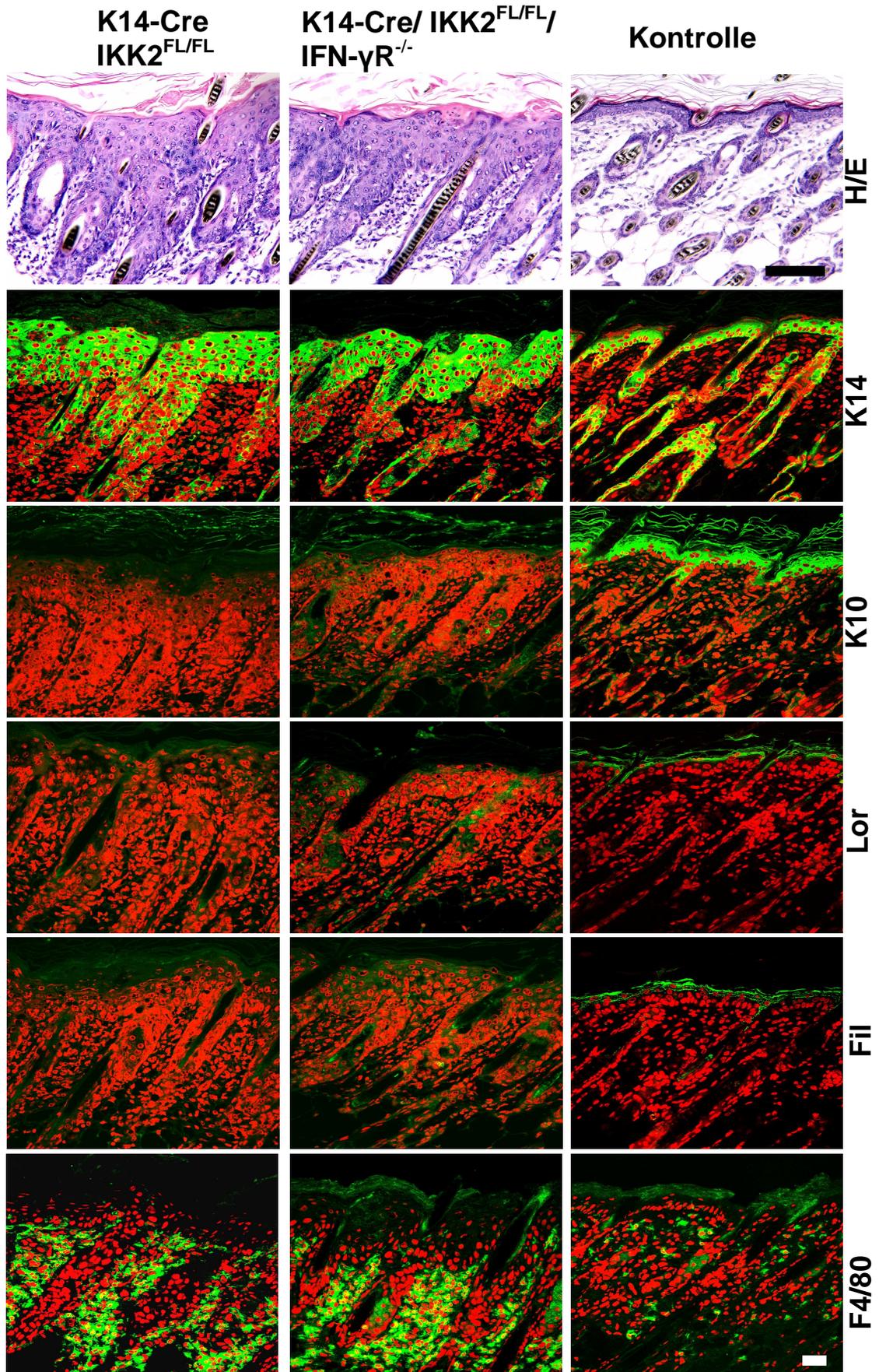


Abbildung 3.22: Gezielte Deletion des IFN- γ Rezeptors verhindert nicht die Ausbildung des entzündlichen Phänotyps in K14-Cre/IKK2^{FL/FL}-Mäusen.

Die obere Reihe zeigt H/E gefärbte Hautschnitte von K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/IFN- γ R^{-/-}, K14-Cre/IKK2^{FL/FL}- und Kontrollmäusen. Die immunhistologischen Bilder zeigen Hautschnitte der entsprechenden Mäuse, die mit Antikörpern gegen die epidermalen Differenzierungsmarker K14, K10, Lor und Fil sowie mit Antikörpern gegen F4/80 gefärbt wurden (grün). Zusätzlich wurden die Hautschnitte mit Propidiumiodid (rot) angefärbt, um die Hautstruktur zu visualisieren. Skalierungsbalken 100 μ m (H/E); 40 μ m (Immunhistologische Färbungen).

4 Diskussion

4.1 Induzierte IKK2-Deletion in der Epidermis von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Adulte K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit einer induzierten Deletion von IKK2 in der Epidermis zeigen einen ähnlichen entzündlichen Phänotyp in der Haut wie neugeborene Mäuse mit epidermisspezifischer IKK2-Deletion. Das bedeutet, dass die entzündliche Hauterkrankung eine direkte Konsequenz der epidermalen Deletion von IKK2 ist und nicht mit der perinatalen Anpassungsreaktion der Haut an die extramaterne Umgebung zusammenhängt. Es muss erwähnt werden, dass die K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse im Alter von sechs Monaten auch ohne Tamoxifen-Behandlung entzündliche Hautveränderungen an Schulter, Hals, Kopf und Brust entwickeln. Diese spontane Deletion wird höchstwahrscheinlich durch einen akkumulativen Effekt der Cre-vermittelten Deletion in der Epidermis ausgelöst. Mit fortschreitendem Lebensalter der Tiere käme es dann durch eine unvollständige Repression der Cre-Rekombinase Aktivität des K14-Cre-ER^{T2} Konstrukts zu einer Deletion von IKK2 in den Keratinozyten. Da diese Deletion irreversibel ist, akkumuliert der Effekt über die Lebenszeit. Diese Annahme begründet sich aus den Beobachtungen, dass bei K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen nach drei bzw. fünf Wochen noch keine Cre-vermittelte Deletion von IKK2 festgestellt werden konnte, diese jedoch in der Haut von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen, die älter als sechs Monate waren, auch ohne Tamoxifen-Behandlung deutlich nachweisbar war. Diese spontane Cre-vermittelte Deletion ließ sich sowohl in entzündlich veränderten Hautarealen als auch in phänotypisch unauffälliger Haut nachweisen, allerdings nie in Mäusen, die kein K14-Cre-ER^{T2}-Transgen besaßen. Dies schließt aus, dass die Cre-vermittelte IKK2-Deletion eine Folge des entzündlichen Hautphänotyps ist und spricht im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Pasparakis et. al, 2002 dafür, dass die Deletion der Entwicklung entzündlicher Hautveränderungen vorausgeht. In diesem Falle wäre davon auszugehen, dass eine bestimmte Anzahl (Schwellenwert) von

Keratinocyten mit einer Deletion von IKK2 in der Haut von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen vorkommen muss, um den Phänotyp auszulösen. Bleibt die Anzahl unter dieser Schwelle, zeigt die Haut keine Auffälligkeiten, obwohl auch dort Keratinocyten mit einer Deletion vorhanden sind.

Für die spontane Deletion als Folge einer unzureichenden Repression der Cre-Aktivität im K14-Cre-ER^{T2}-Konstrukt sprechen auch andere Arbeiten, in denen dieses Konstrukt zur Anwendung kam (Vasioukhin et al., 1999; Bleul et al., 2006; Benitah et al., 2007).

4.1.1 Bildung epidermaler Zellaggregate in der Dermis von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Die Hemmung der NF- κ B - Aktivierung in der Epidermis von Mäusen durch die Expression einer nicht degradierbaren Form von I κ B α (I κ B α -superrepressor) unter der Kontrolle eines Keratin 5 Promotors (K5-I κ B α) führt zu einer entzündlichen Hauterkrankung mit epidermalen Veränderungen. Zudem treten 16 Wochen nach Geburt der Tiere invasive Plattenepithelkarzinome auf, was von den Autoren als Folge der chronischen Entzündung interpretiert wurde (van Hogerlinden et al., 1999, 2004). Auch die K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse zeigen starke entzündliche Hautveränderungen, sowie epitheliale Zellformationen in der Dermis, die teilweise tumorähnliche Strukturen aufweisen. Makroskopisch lassen sich in diesen Tieren allerdings bis zum Alter von elf Monaten keine überzeugenden Hinweise auf die Anwesenheit von Hauttumoren finden. Die histologischen Untersuchungen der in der Dermis vorkommenden epithelialen Zellformationen ergab, dass wichtige Kriterien für maligne Tumoren der Epidermis nicht vorhanden sind, nämlich atypische Keratinocyten, ausgeprägte Zell- und Kernpolymorphie, Kernhyperchromasie, häufige und atypische Mitosen, Hornperlenbildung sowie Zeichen des invasiven Wachstums. Die Immunfärbungen der Marker für die interfollikuläre epidermale Differenzierung Keratin 14, Keratin 10 und Filaggrin sowie für Haarmatrix- Differenzierung zeigen das für epidermale Zysten bzw. Überreste zerstörter Haarfollikel typische Muster. Die Färbung gegen Laminin 5 belegt zudem, dass die epithelialen Zellaggregate in der Dermis von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen eine intakte Basalmembran haben. Insofern handelt es sich bei den epithelialen Strukturen in der Dermis

von K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen um so genannte pseudokarzinomatöse, hyperplastische Veränderungen, wie sie typischerweise in chronisch entzündlichen Hautläsionen auftreten können (Kirkham, 2005). Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit es unwahrscheinlich machen, dass eine Deletion von IKK2 in der Epidermis hinreichend für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen ist, lässt sich eine mögliche maligne Progression der beobachteten Hautveränderungen nicht mit völliger Sicherheit ausschließen. Eine plausible Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zu den K5-IkBa Mäusen könnte in der Verwendung unterschiedlicher Mausstämme liegen. Die K14-Cre-ER^{T2}IKK2^{FL/FL} Mäuse haben einen C57Bl6-Hintergrund. Dagegen sind die K5-IkBa-Mäuse in einen FVB/N-Hintergrund gezüchtet worden. Dieser Stamm ist dafür bekannt, sensibler für die Entwicklung von Hauttumoren zu sein (Hennings et al., 1993, Woodworth et al., 2004). Die Tatsache, dass K5-IkBa-Mäuse nur im FVB/N-Hintergrund Hauttumore bilden, aber nicht im reinen C57Bl6-Hintergrund (R. Toftgard, persönliche Kommunikation), unterstützt diese These.

4.1.2 Entwicklung eines psoriasis-ähnlichen Hautphänotyps in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} und K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Die Epidermis bildet für den Organismus eine erste Abwehrlinie gegen potenziell gefährliche Einflüsse aus der Umwelt. In der Literatur der letzten Jahre wurde gezeigt, dass die epidermalen Keratinozyten nicht nur mechanische Stabilität bieten und eine Barrierefunktion übernehmen, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und der Regulation von Entzündungsvorgängen in der Haut spielen können (Carroll et al., 1995; Cook et al., 1997; Pasparakis et al., 2002; Sano et al., 2005). Obwohl es bekannt ist, dass Keratinozyten pro- inflammatorische Mediatoren sezernieren können, sind die Mechanismen, die zur Ausschüttung dieser Stoffe führen, kaum erforscht. In Pasparakis et al., 2002 wurde gezeigt, dass die selektive Deletion von IKK2 in epidermalen Keratinozyten eine starke entzündliche Reaktion in der Haut bewirkt. Dabei zeigt der entzündliche Phänotyp der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} und K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse alle wichtigen histologischen Besonderheiten der Psoriasis des Menschen. Die Diagnose der Psoriasis wird in der Praxis durch eine bestimmte Konstellation rein deskriptiver

makroskopischer und histopathologischer Kriterien gestellt (wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben). Daneben wurde in den letzten Jahren über einige funktionelle Parameter im Zusammenhang mit Psoriasis berichtet, die allerdings keine absolute Spezifität für dieses Krankheitsbild aufweisen. Dies sind die Aktivierung von STAT3 und ERK 1/2, die regelmäßig in psoriatischer Epidermis, jedoch nicht in gesunder Epidermis gefunden werden (Haase et al., 2001; Sano et al., 2005). Eine Aktivierung von ERK1/2 findet sich offenbar bei zahlreichen hyperproliferativen Zuständen der Epidermis und ist damit eher ein Parameter für Hyperproliferation der Keratinozyten. Solche Zustände sind neben der Psoriasis die Wundheilung (Haase et al., 2001; Tschardt et al., unpublizierte Daten), Plattenepithelkarzinome der Haut (Albanell et al., 2001) und die paraneoplastische Hyperproliferation epidermaler Keratinozyten (Akanthosis nigricans maligna) (Haase et al., 2002). Obwohl die Aktivierung von STAT3 in epidermalen Keratinozyten eine höhere Spezifität für Psoriasis zu haben scheint, da sie in anderen entzündlich- hyperproliferativen Hauterkrankungen nicht gefunden wurde (Sano et al., 2005), ist auch hier kein absolut spezifischer Zusammenhang gegeben, da auch in der Wundheilung eine starke STAT3- Aktivierung vorliegt (Tschardt et al., J. Cell. Sci. (in press)).

4.2 Pathogene Rolle der Immunzellen und Zytokine bei der psoriasis-ähnlichen Hauterkrankung in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse

4.2.1 Die Rolle der T-Lymphozyten in der Pathogenese der Psoriasis und in den psoriasis-ähnlichen Hautmodellen

Frühere Studien haben gezeigt, dass gezielte Mutationen in der epidermalen Schicht der Haut zur Ausbildung eines Psoriasis- ähnlichen Phänotyps führen können (Carroll et al., 1995; Cook et al., 1997; Cook et al., 2004; Sano et al., 2005; Zenz et al., 2005). Die dabei wirksamen pathogenetischen Mechanismen sind jedoch bis heute nicht aufgeklärt. Der Phänotyp der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse ist abhängig von Immunzellen mit pro-inflammatorischer Aktivität; dies ist auch für den psoriatischen Phänotyp beim Menschen belegt

(Demidem et al., 1991). Allerdings sind bei den oben angegebenen Mausmodellen die genetisch veränderten Keratinozyten, und nicht die eindringenden Immunzellen, die den Phänotyp auslösende Zellpopulation. Offenbar kommt es durch eine Fehlregulation in den Keratinozyten zu einem verstärkten Einwandern von Makrophagen, Granulozyten, T-Zellen und Mastzellen in die Dermis.

Um die Rolle der T-Lymphozyten näher zu analysieren, wurden T-Zell Rezeptor- α (TCR α) defiziente Mäuse mit K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen gekreuzt. Die daraus entstandenen Mäuse mit dem Genotyp K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/TCR α ^{-/-} bilden keine reifen $\alpha\beta$ T-Zellen aus (Mombaerts et al., 1992). Bemerkenswert ist, dass die K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/TCR α ^{-/-} Mäuse auch ohne $\alpha\beta$ T-Lymphozyten den gleichen Phänotyp wie die K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse entwickeln und nach wie vor alle Kriterien einer Psoriasis-ähnlichen Hauterkrankung aufweisen. Damit sind $\alpha\beta$ T-Lymphozyten entbehrlich für die Entzündung und Hyperproliferation in der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen (Pasparakis et al., 2002). Dies steht im Widerspruch zu gegenwärtigen Auffassungen über die Immunpathogenese der Psoriasis. Hier wird den T-Lymphozyten eine wichtige pathogenetische Rolle zugeschrieben (Robert et al., 1999; Nickoloff et al., 2000; Schon et al., 2005). Es gibt Mausmodelle die diesen Eindruck unterstützen. Im K5.STAT3 Mausmodell wird in den epidermalen Keratinozyten aktiviertes STAT3 konstitutiv exprimiert. Nach einer Injektion von aktivierten T-Zellen in die Dermis der K5.STAT3 Mäuse konnte ein psoriatischer Hautphänotyp ausgelöst werden (Sano et al., 2005). Hierbei wird aber die Untersuchung von anderen Immunzellpopulationen, die auch zum psoriatischen Hautphänotyp beitragen könnten, vernachlässigt. Es bleibt daher unklar, ob T-Zellen der alleinige Grund für den Phänotyp in K5.STAT3-Mäusen sind. Beim zuletzt beschriebenen psoriasis-ähnlichen Hautphänotyp von Mäusen mit einer induzierten hautspezifischen Deletion von JunB/c-Jun (Zenz et al., 2005) werden T-Zellen nicht als Grund oder essenzieller Bestandteil der Pathogenese gesehen, sondern lediglich als Verstärker der Entzündungsvorgänge in der Haut.

Die Unklarheit über die pathogenetischen Mechanismen der Psoriasis beim Menschen führt dazu, dass die Entität Psoriasis weiterhin überwiegend durch klinische und histologische Kriterien definiert wird. Die direkte Anwendung von

Ergebnissen aus Studien in Mausmodellen auf das Krankheitsbild beim Menschen ist problematisch, da es Unterschiede in der Anatomie der murinen Haut im Vergleich zur humanen Haut gibt und die in genetischen Modellen erlangten Ergebnisse mit den gegenwärtig vorhandenen Methoden nur bedingt am Menschen reproduziert werden können. Allerdings bilden solche Daten eine Grundlage für die Diskussion über die Pathogenese der Psoriasis und die Rolle einzelner Immunzellen darin (Nickoloff et al., 2000, Haase et al., 2004).

4.2.2 Die Rolle der Hautmakrophagen in der von Keratinozyten ausgelösten Psoriasis-ähnlichen Entzündung in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen

Nachdem gezeigt wurde, dass $\alpha\beta$ T-Lymphozyten im K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mausmodell nicht kausal an der Entstehung des Phänotyps beteiligt sind (Pasparakis et al., 2002), wurden weitere Immunzellpopulationen auf ihre mögliche pathogenetische Bedeutung hin untersucht. Da es in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen zu einer massiven Einwanderung von Makrophagen in die Dermis kommt, wurde diese Population zunächst weiter untersucht. Sie besteht aus Makrophagen, die die klassischen Aktivierungsmarker (CD14, CD11b, CD16/32) exprimieren und somit zu den klassisch aktivierten Makrophagen gehören. Die Zellen zeigen auch eine Expression von CD206. In klassisch aktivierten Makrophagen wird CD206 nur reduziert exprimiert (Ezekowitz et al., 1984). Der Mannoserezeptor CD206 ist vor allem ein Kennzeichen/Marker für unreife dendritische Zellen. Es wurde gezeigt, dass unter entzündlichen Bedingungen in der Haut wie z.B. bei der Psoriasis, auch dendritische epidermale Zellen jedoch nicht Langerhanszellen, CD206 exprimieren (Wollenberg et al., 2002). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass in den Cre-K14/IKK2^{FL/FL} Mäusen eine alternativ aktivierte Population von Makrophagen zu dendritischen Zellen reift und in der Dermis akkumuliert. Frühere Studien in humaner psoriatischer Haut beschreiben, dass ein Teil der Hautmakrophagen an die Junctionszone von Dermis/Epidermis migriert und dort möglicherweise mit den epidermalen Keratinozyten kommuniziert. Diese Subpopulation wird auch als „epithelium-lining macrophages“ bezeichnet (Weber-Matthiesen et al., 1990; van den Oord et al., 1994). In der Haut von

K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen kann ein ähnliches Phänomen beobachtet werden: Spindelförmige Makrophagen akkumulieren direkt an der epidermalen Basalmembran. Diese Zellen zeigen eine positive CD83-Färbung. CD83 ist ein Adhäsionsrezeptor auf der Oberfläche von myeloiden dendritischen Zellen, die aus Monozyten/Makrophagen entstanden sind, der aber bereits in diesen synthetisiert wird und hier zytoplasmatisch vorliegt (Cao et al., 2005). CD83-positive Zellen wurden auch in der oberen Dermis von psoriatischen Hautläsionen beschrieben (Koga et al., 2002) und es wurde gezeigt, dass es eine starke Korrelation zwischen der Anzahl dieser Zellen und der Schwere der Erkrankung in mit Efalizumab behandelte psoriatische Haut gab (Lowes et al., 2005). Die starke Expression von CD83 an der Junctionszone von Dermis/Epidermis in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen könnte ein Hinweis darauf sein, dass Faktoren vorhanden sind, die eine verstärkte Makrophagendifferenzierung zu dendritischen Zellen bewirken. Interessanterweise waren in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen nur wenige dieser Zellen gleichzeitig positiv für CD80, ein co-stimulatorisches Molekül für den CD28-Liganden der T-Lymphozyten. Das bedeutet möglicherweise in Übereinstimmung mit der nicht-essentiellen Rolle von T-Lymphozyten, dass es trotz der hohen Dichte der Makrophagen und dendritischen Zellen in der Dermis zu einer verhältnismäßig schwachen Stimulation der T-Zellen kommt.

Die Depletion der Makrophagen mit Clodronat-Liposomen in der Dermis von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen bewirkt eine deutliche Abschwächung des psoriasis-ähnlichen Phänotyps. Die Phosphorylierung von STAT3 ist in den mit Clodronat-Liposomen behandelten Mäusen ähnlich wie in Wildtypmäusen. Das bedeutet, dass die Makrophagen essentiell sind, um den psoriasis-ähnlichen Phänotyp in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen auszulösen und/oder zu unterhalten. Es wäre möglich, dass die Depletion der Makrophagen in der Haut einen Zellpool eliminiert, der normalerweise eine Quelle für hoch differenzierte Effektorzellen wie CD83-positive dendritische Zellen ist. Es ist nur sehr wenig über die funktionelle Rolle von Makrophagen in der Initiation und Aufrechterhaltung von entzündlichen Hautreaktionen bekannt. Auch in anderen Untersuchungen wird Makrophagen eine pathogene Rolle bei entzündlichen Hautveränderungen zugesprochen, wie in einer Arbeit über

irritative Dermatitis (Thepen et al., 2000) oder bei dem T-Zell abhängigen Psoriasis-Maus-Modell in der Arbeit von Wang et al., 2006. Beim CD18 hypomorphen Mausmodell von Wang et al. 2006 wird beschrieben, dass es neben der verstärkten T-Zell-Aktivität in den Läsionen auch zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl von Makrophagen in der Haut kommt. Die Depletion der Makrophagen in diesen Tieren führt zu einer deutlichen Abschwächung des Phänotyps und zu einer signifikanten Verminderung der CD4⁺ T-Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Makrophagen bei der Entzündungsreaktion der Haut und in der Pathogenese der Psoriasis einen höheren Stellenwert haben als bisher angenommen. Die Tatsache, dass eine gezielte Mutation in epidermalen Keratinozyten eine Makrophagen-abhängige entzündliche Hautreaktion auslöst, die unabhängig von $\alpha\beta$ T-Zellen ist, zeigt, dass die Antigenpräsentation nicht die einzige Funktion der Makrophagen in entzündlicher Haut ist.

4.2.3 Einfluss der Granulozyten auf den psoriasis-ähnlichen Phänotyp der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse

Die Migration von Granulozyten in die Haut und die Bildung von Mikroabszessen sind charakteristische Merkmale der Psoriasis. In Makrophagen-depletierter Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen war, im Gegensatz zum ursprünglich beschriebenen Phänotyp, keine Akkumulation von Granulozyten feststellbar. Es ist belegt, dass Clodronat-Liposomen nicht von nicht-phagozytierenden Zellen (Claassen et al., 1990) oder Granulozyten (Qian et al., 1994) aufgenommen werden können. Das heißt, dass das Fehlen der Granulozyten in der Dermis von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen nicht auf eine Depletion durch Clodronat-Liposomen zurückgeführt werden kann. Das Einwandern der Granulozyten in die Dermis der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse ist somit direkt oder indirekt durch Makrophagen vermittelt.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Abschwächung des entzündlichen Phänotyps tatsächlich eine direkte Konsequenz der Makrophagen-Depletion ist oder sekundär eine Folge der verhinderten Einwanderung von Granulozyten, wurden die K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse mit CD18 defizienten

Mäusen gekreuzt (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-}). Die Abwesenheit der Granulozyten in der Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-} Mäusen führte nicht zu einer deutlichen Verbesserung der psoriasis-ähnlichen Hauterkrankung. Das erscheint überraschend, wenn man die große Anzahl der Granulozyten in der Dermis der erkrankten Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen berücksichtigt. Bisherige Beobachtungen am fsn/fsn Mausmodell (flaky skin mouse) zeigen, dass eine Antikörper-vermittelte Depletion von Granulozyten zu einer Reduktion des hyperproliferativen Hautphänotyps führt (Schon et al., 2000). Allerdings kann die Elimination der Granulozyten aus der Haut dieser Tiere die Erkrankung nicht komplett unterdrücken. Das könnte bedeuten, dass die treibende Kraft des pathogenen Prozesses unabhängig von der Präsenz der Granulozyten in der Haut ist. In Verbindung mit den Ergebnissen dieser Arbeit scheint daher eine Inhibierung der Granulozyten-Migration in die Dermis kein viel versprechender therapeutischer Ansatz zu sein, um Psoriasis zu behandeln.

4.2.4 Die Bedeutung der Zytokine TNF und IFN- γ für die Entwicklung des psoriasis-ähnlichen Phänotyps in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen

TNF und IFN- γ sind die zwei wichtigsten Mediatoren für die klassische Aktivierung von Makrophagen (Mosser, 2003). Mit der Affymetrix-Chipanalyse konnten mehrere IFN- γ regulierte Proteine identifiziert werden, deren erhöhte Expression im Vergleich zu normaler Maushaut bereits früh in der Entwicklung des Phänotyps vorhanden war und mit zunehmender Schwere des Phänotyps weiter anstieg. Die Deletion des IFN- γ Rezeptors in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen zeigt jedoch, dass IFN- γ scheinbar keinen Einfluß auf den Phänotyp hat. Der Phänotyp der K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/IFN- γ R^{-/-} Mäuse gleicht in Verlauf und der Erscheinungsform dem Phänotyp der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse. Er entwickelt sich jedoch bei den K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/IFN- γ R^{-/-} Mäusen etwas verzögert. Das bedeutet, dass die Anwesenheit von IFN- γ für die Ausbildung des Phänotyps nicht notwendig ist, aber dessen Verlauf beschleunigt. Viele Zelltypen synthetisieren IFN- γ nur im aktivierten Zustand (Young, 1996; Tominaga et al., 2000; Gattoni et al., 2006). IFN- γ wiederum aktiviert T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und vor allem Makrophagen

(Mosser, 2003; Gattoni et al., 2006). Das könnte bedeuten, dass die erhöhte Expression von IFN- γ in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen durch vorhandene Entzündungsprozesse zusätzlich ausgelöst wird und die Immunantwort nur verstärkt.

Dagegen wurde in dieser Arbeit und in Pasparakis et al., 2002 gezeigt, dass TNF- vermittelte Signale essentiell für die Entstehung des entzündlichen Hautphänotyps sind. Auch die Ergebnisse in van Hogerlinden et al., 1999 zeigen die besondere Stellung von TNF in entzündlicher Haut. Es wurden transgene Tiere verwendet, die einen Super-Repressor von I κ B α unter der Kontrolle eines K5-Promoters exprimieren. Die Expression des Super-Repressors führt zu einer selektiven Hemmung des NF- κ B/Rel Signals in der Epidermis. Dies führt zu einer gestörten epidermalen Homöostase, einer erhöhten Zahl von apoptotischen Keratinozyten, sowie zur spontanen Bildung von Karzinomen (van Hogerlinden et al., 1999). Durch das Einkreuzen der K5-I κ B α -Maus in den Tnfr-I^{-/-} Hintergrund (K5-I κ B α /Tnfr-I^{-/-}) wurde die inflammatorische Reaktion und die Tumorentstehung geblockt. Hinsichtlich der Rolle von TNF für die Makrophagen-Aktivierung ist es interessant, dass es in K5-I κ B α /Tnfr-I^{-/-} Mäusen nicht möglich ist, den inflammatorischen hyperproliferativen Phänotyp durch die selektive Transplantation von Immunzellen aus Tnfr-I positiven Knochenmarkszellen im Tnfr-negativen Hintergrund zu rekonstituieren (Lind et al., 2004). Das bedeutet in diesem Zusammenhang, dass nicht aus dem Knochenmark stammende Zellen für den Empfang der für den Phänotyp relevanten Tnfr-I vermittelten Signale verantwortlich sind, sondern andere Hautzellen Tnfr-I vermittelte Signale aufnehmen, die ihrerseits Signalmechanismen in Gang setzen, die zu einer psoriasis-ähnlichen Hauterkrankung führen.

Die Resultate dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Aktivierung der Hautmakrophagen in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen nicht nur auf den klassischen Mechanismen der Makrophagen-Stimulation durch TNF- α und IFN- γ basiert. Die Haut von K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen enthält, wie die humane psoriatische Haut, Makrophagen, die klassische und alternative Aktivierungsmarker exprimieren. Interessanterweise ist aber TNF, wie bei der humanen Psoriasis

oder dem CD18-hypomorphen Mausmodell (Wang et al., 2006), wichtig für die Entwicklung der psoriasis-ähnlichen Hauterkrankung. Dafür sprechen auch die Hauttransplantations-Experimente mit Hauttransplantaten aus TNF-defizienten Mäusen mit einer Deletion von RelA/c-Rel auf Rag^{-/-} Mäuse. So wie das Fehlen des TNF- α Rezeptors in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/TNFRI^{-/-} Mäusen die Ausbildung der psoriasis-ähnlichen Hauterkrankung und den damit verbundenen Tod der Tiere verhindert, ist die Deletion von RelA/c-Rel im TNF α -defizienten Hintergrund (rela^{-/-} c-rel^{-/-} tnfa^{-/-}) im embryonalen Stadium nicht mehr letal. Hauttransplantate der rela^{-/-} c-rel^{-/-} tnfa^{-/-} Mäuse auf Rag^{-/-} Mäuse entwickeln einen hyperproliferativen inflammatorischen Phänotyp mit Hyper- und Parakeratose, obwohl kein von Keratinozyten gebildetes TNF- α vorhanden ist (Gugasyan et al., 2004). Rag^{-/-} Mäuse bilden keine reifen T- und B-Lymphozyten aus. Makrophagen dagegen können weiterhin in die Dermis eindringen und könnten womöglich pathogenes TNF- α bilden, das den Phänotyp auf den Hauttransplantaten auslöst.

So ist es auch wahrscheinlich, dass Makrophagen, die bereits früher als Hauptquelle von TNF in der Haut identifiziert wurden (Piguet, 1993), pathogenes TNF in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen produzieren. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass ein Antikörper gegen die p40 Untereinheit von IL-12, die eine gemeinsame Untereinheit mit IL-23 bildet, eine Verbesserung der Psoriasis bewirkt, wenn er systemisch verabreicht wird (Kauffman et al., 2004). IL-12 wird von Makrophagen produziert und kann die autokrine IFN- γ Produktion stimulieren (Munder et al., 1998). Das führt zu einer verstärkten klassischen Aktivierung von Makrophagen. Über IL-23 ist bekannt, dass es von Keratinozyten in psoriatischen Läsionen produziert wird (Lee et al., 2004; Piskin et al., 2006) und direkt Makrophagen aktivieren kann (Alber et al., 2006). Die Behandlung mit IL-11 oder IL-4 führt ebenfalls zu einer Verbesserung der psoriatischen Hauterkrankung (Trepicchio et al., 1999; Ghoreschi et al., 2003). IL-11 und IL-4 inhibieren beide die TNF-Produktion in aktivierten Makrophagen (Trepicchio et al., 1998; Hart et al., 1991). Diese Ergebnisse untermauern eine mögliche pathogenetische Bedeutung von Makrophagen in der Psoriasis.

4.2.5 Kommunikation zwischen Keratinozyten und Immunzellen in dem psoriasis-ähnlichen Phänotyp der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} und K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse

Es ist möglich, dass es einen direkten Austausch von Informationen zwischen epidermalen Keratinozyten und Hautmakrophagen in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen gibt. Eine zukünftige Aufgabe ist, die Mechanismen dieser Kommunikation zu identifizieren. Geht man von dieser Annahme aus, könnte ein Grund für den psoriasis-ähnlichen Hautphänotyp der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} und K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse eine gestörte Kommunikation zwischen Keratinozyten und Makrophagen sein.

Keratinozyten bilden einen wichtigen Bestandteil der Hautbarriere. In den letzten Jahren verdichteten sich die Hinweise, dass sie auch an immunologischen Abwehrfunktionen beteiligt sind. Diese werden beispielsweise durch die Ausschüttung von IL-1 als pro-inflammatorisches Zytokin gesteuert (Kupper, 1988; Baggiolini et al., 1989; Larsen et al., 1989). IL-1 aktiviert dann in der Folge pro-inflammatorische Zellen wie Makrophagen (Baggiolini et al., 1989; Larsen et al., 1989). TNF- α , das von IL-1 stimulierten Keratinozyten und Makrophagen freigesetzt wird, steigert die Immunantwort, indem es z.B. weitere Makrophagen aktiviert (Balkwill, 1989; Mosser, 2003) oder die MHC-Expression und die Antigenpräsentation gegenüber Lymphozyten erhöht (Fiero et al., 1987). Ebenfalls werden durch TNF- α Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen induziert, die das Einwandern von Immunzellen in die Dermis bewirken (Dustin et al., 1986; Prober et al., 1986; Bevilacqua et al., 1989). Die Zytokine IL-1 α , IL-1 β und TNF- α besitzen deshalb bei der Immunantwort der Haut eine besondere Stellung. Sie besitzen die Fähigkeit, die Produktion vieler sekundärer Zytokine zu induzieren, die eine chemotaktische und Leukozyten-aktivierende Wirkung aufweisen und einen direkten Effekt auf die Expression von Endothelzell-Adhäsionsmolekülen haben (Kupper, 1990). Es ist bekannt, dass die Gene von IL-1 α , IL-1 β und TNF- α von NF- κ B reguliert werden (Kumar et al., 2004). Es ist deshalb vorstellbar, dass die Deletion von IKK2 in epidermalen Keratinozyten und die damit verbundene Hemmung des NF κ B Signaltransduktionsweges zu einer vermehrten bzw. andauernden Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine

wie IL-1 und TNF- α führt. Das könnte eine unkontrollierte Migration und Akkumulation der Makrophagen in die Dermis bewirken. Die in der Dermis akkumulierenden Makrophagen würden fortlaufend pathogenes TNF- α produzieren, das weitere Makrophagen in die Dermis migrieren lässt und die Entzündung immer weiter verstärkt. In Einklang mit diesem Szenario steht die Tatsache, dass die IKK2-defizienten epidermalen Keratinozyten als Quelle einer gesteigerten IL-1 β Produktion in den K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen ausgemacht werden konnten (Pasparakis et al., 2002).

Die Frage, warum TNF- α bei der Entstehung des Phänotyps ein entscheidender Faktor ist, könnte durch die TNF- α -induzierten Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen beantwortet werden. TNF- α induziert neben IL-1 die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 (Collins et al., 1995). Es wurde gezeigt, dass eine Adiponektin-vermittelte Hemmung der TNF- α induzierten Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 eine Bindung von Monozyten an die Endotheloberfläche verhindert (Ouchi et al., 1999).

Die TNF- α Rezeptor-Defizienz oder die Neutralisation von TNF mit huTNFR:Fc hätten ähnliche Wirkungen auf die TNF- α induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1. Das würde erklären, warum TNF- α defiziente K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/TNFR-I^{-/-}) den Phänotyp nicht entwickeln und die Anti-TNF (huTNFR:Fc) behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Tiere eine deutliche Abschwächung des Phänotyps zeigen. Bei den K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/TNFR-I^{-/-} oder huTNFR:Fc behandelten K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Tieren würden für die Monozyten zu wenige oder keine Adhäsionsmoleküle bereit stehen, um an die Endotheloberfläche zu binden. Die Monozyten können das Endothel nicht überqueren, um sich in der Dermis zu Hautmakrophagen auszubilden. Die unkontrollierte Migration und Akkumulation der Makrophagen in der Dermis würde dadurch unterbunden werden und damit auch die Ausbildung des Phänotyps.

Die Frage, ob die Akkumulation der Makrophagen in der Dermis eine direkte Konsequenz der veränderten Signaltransduktion in epidermalen Keratinozyten ist, oder durch andere residente Hautzellen vermittelt wird, bleibt vorerst

unklar. Residierende Hautzellen, wie z.B. Fibroblasten und Endothelzellen könnten von Keratinozyten ausgehende Signale empfangen und diese an die Makrophagen direkt oder über eine weitere Zellpopulation weiterleiten. Alle Hautzellen exprimieren den TNF-I Rezeptor, was ihnen erlaubt, TNF-vermittelte Signale von Nachbarzellen oder aus verschiedenen Hautregionen zu empfangen. Sie könnten so an entzündlichen Hautveränderungen beteiligt sein. Speziell für die Psoriasis gibt es Hinweise auf mehrere verschiedene Zelltypen, die normal in der Haut vorkommen und pathogen relevant sein könnten: Keratinozyten (Carroll et al., 1995; Cook et al., 1997), Fibroblasten (Dimon-Gadal et al., 2000; Miura et al., 2000), aus Monozyten entstandene Immunozyten (Krueger et al., 1978; Wrone-Smith et al., 1996), T-Zellen (Schön et al., 1997, Boyman et al., 2004) und Mastzellen (Schubert et al., 1985; Toruniowa et al., 1988;). Es ist daher möglich, dass Psoriasis das Ergebnis unterschiedlich aktivierter Mechanismen der Wirtsabwehr und Hautreparatur ist und die Pathogenese nicht nur auf einem einzigen Zelltyp beruht, sondern mehrere unterschiedliche Zellpopulationen einbezieht, wie z.B. T-Lymphozyten und Makrophagen. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die großen interindividuellen Unterschiede von Psoriasis-Patienten im Ansprechen auf eine bestimmte Therapie. Bis heute gibt es kein einzelnes Medikament, das bei allen Psoriasis-Patienten zu einer bedeutsamen Verbesserung der Krankheitssymptome führt. In diesem Kontext erscheint es interessant, dass die gegen spezifische Immunzellpopulationen gerichteten Therapien (z.B. anti CD45, anti CD4) viel weniger effektiv sind als TNF-neutralisierende Behandlungsstrategien (z.B. Infliximab, Adalimumab) (Kleyn et al., 2006; Pitarch et al., 2007).

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen die Möglichkeit auf, dass die Psoriasis nicht ausschließlich T-Zell-vermittelt sein muss. Bei den Untersuchungen zur Pathogenese der Psoriasis ist es nötig, auch andere Zellen wie Makrophagen in Betracht zu ziehen. Im K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mausmodell sind Makrophagen und TNF- α entscheidende Faktoren, die zum Psoriasis-ähnlichen Hautphänotyp führen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Rolle der Makrophagen in der Pathogenese der entzündlichen Hauterkrankung über die Funktion antigenpräsentierender Zellen hinausgeht.

Sie scheinen eine komplexere Rolle in der Immunabwehr einzunehmen als bisher angenommen.

5 Zusammenfassung-Abstract

5.1 Zusammenfassung

Bei Mäusen mit einer epidermis-spezifischen Deletion von I kappa B kinase 2 (IKK2) (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}) konnte gezeigt werden, dass epidermale Keratinozyten eine dominante Rolle in der Initiation einer psoriasis-ähnlichen entzündlichen Hautreaktion spielen können. Um Langzeitfolgen einer IKK2-Deletion in der adulten Maushaut untersuchen zu können, wurden Mäuse mit einer Tamoxifen-induzierbaren Cre- Rekombinase unter der Kontrolle eines humanen Keratin 14 Promotors (K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL}) gezüchtet. Die K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} Mäuse werden normal geboren und zeigen keine Anzeichen einer Hauterkrankung bis zu einem Alter von 6 Monaten. Ausgelöst wird die Deletion von IKK2 durch die Behandlung mit Tamoxifen auf der Rückenhaut oder durch spontane Deletion, also ohne Tamoxifen-Behandlung, bei Mäusen die älter waren als 6 Monate. Diese Deletion löst dramatische lokale Hautveränderungen aus, die mit einer Migration von Entzündungszellen in die Dermis einhergehen. Die Haut zeigt zerstörte Haarfollikel, eine pseudokarzinomatöse Hyperplasie der Epidermis, aber keine Tumor-Formationen. Das hyperplastische Epithel zeigt eine verstärkte Phosphorylierung von signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) und extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2), ähnlich wie in psoriatischer Epidermis. Damit besteht eine direkte Korrelation zwischen epidermis- spezifischer Deletion von IKK2 und dem Psoriasis- ähnlichen Hautphänotyp. Wie bei der Psoriasis, zeigt die entzündliche Hauterkrankung der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse nach Behandlung mit einem TNF-neutralisierenden Agens eine starke Verbesserung. Um die pathogenetische Relevanz einzelner Immunzellpopulationen für die Entwicklung des Phänotyps zu erforschen, wurden selektiv Makrophagen und Granulozyten aus der Haut der K14-Cre/IKK2^{FL/FL} Mäuse eliminiert. Die Elimination der Hautmakrophagen durch subkutane Injektion von Clodronat-Liposomen bewirkt eine Hemmung der Granulozyten-Migration in die Haut und führt zu einer starken Abschwächung der psoriasis-ähnlichen Hautveränderungen. Die hyperproliferative, entzündliche

Hauterkrankung in den K14Cre/IKK2^{FL/FL} Mäusen ist eine direkte Folge der Makrophagen- Depletion in der Haut, da die Deletion von CD18, die die Migration der Granulozyten, aber nicht die der Makrophagen in die Haut verhindert, zu keinen bedeutenden Veränderungen im Phänotyp führt. Die Deletion des Rezeptors für IFN- γ zeigt, dass die Pathogenese der Hauterkrankung nicht von der klassischen IFN- γ vermittelten Makrophagen-Aktivierung abhängig ist. Die gewonnenen Ergebnisse demonstrieren, dass epidermale Keratinozyten in Mäusen hyperproliferative, entzündliche, IFN- γ -unabhängige Psoriasis-ähnliche Hauterkrankungen auslösen können und die Präsenz von Hautmakrophagen, jedoch nicht von Granulozyten oder $\alpha\beta$ T- Lymphozyten, für die Entwicklung des Phänotyps essentiell ist.

5.2 Abstract

Using mice with an epidermis specific deletion of I kappa B kinase 2 (IKK2) alleles (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}), it was previously shown that epidermal keratinocytes can play a dominant role in the initiation of a psoriasis-like inflammatory skin reaction. In order to investigate long-term consequences of IKK2 deletion in adult skin, mice with floxed IKK2 alleles were generated in which expression of a Tamoxifen-inducible Cre recombinase construct is targeted to epidermal keratinocytes (K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} mice). K14-Cre-ER^{T2}/IKK2^{FL/FL} mice are born normally and do not show signs of a skin disease until the age of 6 months. Deletion of IKK2 can be observed after Tamoxifen application to the back skin or spontaneously, without Tamoxifen application, in mice older than 6 months. This deletion is accompanied by dramatic, localized skin changes that are characterized by invasion of inflammatory cells, hair follicle disruption and pseudoepitheliomatous hyperplasia of the epidermis, but not by tumor formation. The hyperplastic epithelium shows increased phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2), typical features of psoriatic epidermis. These experiments show that there is a direct correlation between the epidermis specific deletion of IKK2 and the psoriasis like skin disease. Like psoriasis, the skin disease of K14-Cre/IKK2^{FL/FL} mice shows pronounced improvement when mice are treated with a TNF-neutralizing agent. It was found previously that this phenotype does not depend on the presence of $\alpha\beta$ T lymphocytes. In order to evaluate contributions of other immune cell populations to the skin disease, macrophages and granulocytes were selectively eliminated from the skin of mice with epidermis-specific deletion of IKK2 (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}). Elimination of skin macrophages by subcutaneous injection of clodronate liposomes was accompanied by inhibition of granulocyte migration into the skin and resulted in a dramatic attenuation of psoriasis-like skin changes. The hyperproliferative,

inflammatory skin disease in K14-Cre/IKK2^{FL/FL} mice was a direct consequence of the presence of macrophages in the skin, as targeted deletion of CD18 (K14-Cre/IKK2^{FL/FL}/CD18^{-/-}), which prevented accumulation of granulocytes but not macrophages, did not lead to major changes in the phenotype. Targeted deletion of the receptor for IFN- γ revealed that the pathogenesis of the skin disease does not depend on classical IFN- γ -mediated macrophage activation. The results demonstrate that in mice epidermal keratinocytes can initiate a hyperproliferative, inflammatory, IFN- γ -independent psoriasis-like skin disease whose development requires essential contributions from skin macrophages but not from granulocytes or $\alpha\beta$ T lymphocytes.

6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Aqua	Wasser
Bidest	zweimal destilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
Cre	Cause Rekombination
cDNA	Komplementäre DNA
CDKN ₂ A	cyclin dependent kinase 2a
CMV	(Zytomegalovirus)
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
ERK	Extracellular Signal- Regulated Protein Kinases
FCS	Fötale Kälber Serum
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GNS	normales Ziegen Serum
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis B virus
HE	Hämatoxilin und Eosinfärbung
HIV-1	Human immunodeficiency virus
HLA	Human Leukocyte Antigen-Komplex
HSV-1	Herpes simplex virus
HTLV-1	Human T-lymphotropic virus
HRP	Meerrettichperoxidase
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor von NF-κB
IKK	Inhibitor κB-Kinasekomplex)
IL	Interleukin
iNOS	induzierbaren NO-Synthasen
K10	Keratin 10
K14	Keratin 14
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

k.o.	Knock-out
LPS	Lipopolysaccharid
MBL	Mannosebindende Lektin
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAK	NF-κB-inducing-kinase
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
ng	Nanogramm
NIK	NF-κB-inducing-kinase
NLS	Nuclear localization signal
NMS	Normal Maus Serum
P	postnatal
p.a.	pro analysi
PAMPs	Pathogen-assoziierte-Molekularmuster
PRRs	pattern recognition receptors
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PECAM	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PEST	Prolin, Glutamin, Serin und Threonin
PFA	Paraformaldehyd
PSORS	psoriasis susceptibility locus
pH	potential of Hydrogen
Ras	<i>rat sarcoma viral</i> oncogene homolog
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	Signal Transducer and Activator of Transkription
TAE	Tris-Acetate
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TBS	Tris buffered saline
TCR	T-Zell Rezeptor
TGFβ	transforming growth factor
TLR	Toll like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
UVB	Wellenlänge oberhalb 300 nm
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VCAM	Vaskuläres Zell Adhäsionsmolekül
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

Abremski, K., and Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *Journal of Biological Chemistry* 259, 1509-1514.

Albanell, J., Codony-Servat, J., Rojo, F., Del Campo, J. M., Sauleda, S., Anido, J., Raspall, G., Giralt, J., Rosello, J., Nicholson, R. I., *et al.* (2001). Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 61, 6500-6510.

Alber, G., Al-Robaiy, S., Kleinschek, M., Knauer, J., Krumbholz, P., Richter, J., Schoeneberger, S., Schuetze, N., Schulz, S., Toepfer, K., *et al.* (2006). Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 107-127.

Anderson, C. F., and Mosser, D. M. (2002). Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* 168, 3697-3701.

Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R. T., Virelizier, J. L., and Dargemont, C. (1997). Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of Cell Science* 110, 369-378.

Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S. L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84, 1045-1049.

Baldi, L., Brown, K., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1996). Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B-alpha. *Journal of Biological Chemistry* 271, 376-379.

Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology* 14, 649-683.

Balkwill, F. R. (1989). Tumour necrosis factor. *Br Med Bull* 45, 389-400.

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

Barker, J. N., Mitra, R. S., Griffiths, C. E., Dixit, V. M., and Nickoloff, B. J. (1991). Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 337, 211-214.

Benitah, S. A., and Watt, F. M. (2007). Epidermal Deletion of Rac1 Causes Stem Cell Depletion, Irrespective of whether Deletion Occurs during Embryogenesis or Adulthood. *J Invest Dermatol*.

- Bevilacqua, M. P.**, Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S., and Gimbrone, M. A., Jr. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 9238-9242.
- Bevilacqua, M. P.**, Stengelin, S., Gimbrone, M. A., Jr., and Seed, B. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* *243*, 1160-1165.
- Bharti, A. C.**, and Aggarwal, B. B. (2002). Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* *64*, 883-888.
- Bleul, C. C.**, Corbeaux, T., Reuter, A., Fisch, P., Monting, J. S., and Boehm, T. (2006). Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* *441*, 992-996.
- Boehncke, W. H.**, Wortmann, S., Kaufmann, R., Mielke, V., and Sterry, W. (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.
- Boyman, O.**, Hefti, H. P., Conrad, C., Nickoloff, B. J., Suter, M., and Nestle, F. O. (2004). Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med* *199*, 731-736.
- Cao, W.**, Lee, S. H., and Lu, J. (2005). CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J* *385*, 85-93.
- Carroll, J. M.**, Romero, M. R., and Watt, F. M. (1995). Suprabasal integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotype resembling psoriasis. *Cell* *83*, 957-968.
- Chaturvedi, V.**, Cesnjaj, M., Bacon, P., Panella, J., Choubey, D., Diaz, M. O., and Nickoloff, B. J. (2003). Role of INK4a/Arf locus-encoded senescent checkpoints activated in normal and psoriatic keratinocytes. *Am J Pathol* *162*, 161-170.
- Chen, F.**, Castranova, V., and Shi, X. (2001). New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol* *159*, 387-397.
- Chen, Z.**, Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., and Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & Development* *9*, 1586-1597.

- Claassen, I.,** Van Rooijen, N., and Claassen, E. (1990). A new method for removal of mononuclear phagocytes from heterogeneous cell populations in vitro, using the liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* *134*, 153-161.
- Clark, S. C.,** and Kamen, R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* *236*, 1229-1237.
- Collins, T.,** Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J* *9*, 899-909.
- Cook, P. W.,** Brown, J. R., Cornell, K. A., and Pittelkow, M. R. (2004). Suprabasal expression of human amphiregulin in the epidermis of transgenic mice induces a severe, early-onset, psoriasis-like skin pathology: expression of amphiregulin in the basal epidermis is also associated with synovitis. *Exp Dermatol* *13*, 347-356.
- Cook, P. W.,** Piepkorn, M., Clegg, C. H., Plowman, G. D., DeMay, J. M., Brown, J. R., and Pittelkow, M. R. (1997). Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J Clin Invest* *100*, 2286-2294.
- Dajee, M.,** Lazarov, M., Zhang, J. Y., Cai, T., Green, C. L., Russell, A. J., Marinkovich, M. P., Tao, S., Lin, Q., Kubo, Y., and Khavari, P. A. (2003). NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* *421*, 639-643.
- Davis, N.,** Ghosh, S., Simmons, D. L., Tempst, P., Liou, H. C., Baltimore, D., and Bose, H. R., Jr. (1991). Rel-associated pp40: an inhibitor of the rel family of transcription factors. *Science* *253*, 1268-1271.
- Delhase, M.,** Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation.[see comment]. *Science* *284*, 309-313.
- Demidem, A.,** Taylor, J. R., Grammer, S. F., and Streilein, J. W. (1991). T-lymphocyte-activating properties of epidermal antigen-presenting cells from normal and psoriatic skin: evidence that psoriatic epidermal antigen-presenting cells resemble cultured normal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* *97*, 454-460.
- Diepgen, T. L.,** and Mahler, V. (2002). The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* *146 Suppl 61*, 1-6.
- Dimon-Gadal, S.,** Gerbaud, P., Therond, P., Guibourdenche, J., Anderson, W. B., Evain-Brion, D., and Raynaud, F. (2000). Increased oxidative damage to fibroblasts in skin with and without lesions in psoriasis. *J Invest Dermatol* *114*, 984-989.

- Dlugosz, A.**, Merlino, G., and Yuspa, S. H. (2002). Progress in cutaneous cancer research. *J Investig Dermatol Symp Proc* 7, 17-26.
- Dorn, B. R.**, Dunn, W. A., Jr., and Progulske-Fox, A. (2002). Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* 4, 1-10.
- Dustin, M. L.**, Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A., and Springer, T. A. (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 137, 245-254.
- Feil, R.**, Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887-10890.
- Feil, R.**, Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 752-757.
- Fiero W.**, Beyaer R, Brouckaert P, Vanhaesbroeck B, Van Ostande X, Van Roy F; Gene cloning and structure-function relationships of cytokines such as TNF and interleukins. *Immunol Lett* 16:219-226, 1987).
- Fiers, W.**, Beyaert, R., Brouckaert, P., Everaerd, B., Haegeman, G., Suffys, P., Tavernier, J., Vandenaabeele, P., Vanhaesebroeck, B., Van Ostad, X., and et al. (1987). Gene cloning and structure-function relationship of cytokines such as TNF and interleukins. *Immunol Lett* 16, 219-226.
- Fleisch, H.** (1989). Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. *Recent Results Cancer Res* 116, 1-28.
- Fracchiolla, N. S.**, Lombardi, L., Salina, M., Migliazza, A., Baldini, L., Berti, E., Cro, L., Polli, E., Maiolo, A. T., and Neri, A. (1993). Structural alterations of the NF-kappa B transcription factor I κ B in lymphoid malignancies. *Oncogene* 8, 2839-2845.
- Frith, J. C.**, Monkkonen, J., Auriola, S., Monkkonen, H., and Rogers, M. J. (2001). The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum* 44, 2201-2210.
- Fuchs, E.** (1990). Epidermal differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 2, 1028-1035.
- Fuchs, E.** (1993). Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl* 17, 197-208.
- Fuchs, E.**, and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63, 345-382.

- Gattoni, A.**, Parlato, A., Vangieri, B., Bresciani, M., and Derna, R. (2006). Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts). *Clin Ter* 157, 377-386.
- Gerber, J. S.**, and Mosser, D. M. (2001). Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol* 166, 6861-6868.
- Ghoreschi, K.**, Thomas, P., Breit, S., Dugas, M., Mailhammer, R., van Eden, W., van der Zee, R., Biedermann, T., Prinz, J., Mack, M., *et al.* (2003). Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med* 9, 40-46.
- Ghosh, S.**, and Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* 344, 678-682.
- Giri, D. K.**, and Aggarwal, B. B. (1998). Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 273, 14008-14014.
- Goodrich, J. A.**, Cutler, G., and Tjian, R. (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 84, 825-830.
- Gratchev, A.**, Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C. E., Schledzewski, K., and Goerdts, S. (2001). Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. *Scand J Immunol* 53, 386-392.
- Grossman, D.**, and Leffell, D. J. (1997). The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. *Arch Dermatol* 133, 1263-1270.
- Gu, H.**, Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting.[see comment]. *Science* 265, 103-106.
- Gugasyan, R.**, Voss, A., Varigos, G., Thomas, T., Grumont, R. J., Kaur, P., Grigoriadis, G., and Gerondakis, S. (2004). The transcription factors c-rel and RelA control epidermal development and homeostasis in embryonic and adult skin via distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 24, 5733-5745.
- Guttridge, D. C.**, Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G., and Baldwin, A. S., Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-5799.
- Haase, I.**, Hobbs, R. M., Romero, M. R., Broad, S., and Watt, F. M. (2001). A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *J Clin Invest* 108, 527-536.

- Haase, I.**, and Hunzelmann, N. (2002). Activation of epidermal growth factor receptor/ERK signaling correlates with suppressed differentiation in malignant acanthosis nigricans. *J Invest Dermatol* 118, 891-893.
- Hafner, M.**, Wenk, J., Nenci, A., Pasparakis, M., Scharffetter-Kochanek, K., Smyth, N., Peters, T., Kess, D., Holtkotter, O., Shephard, P., *et al.* (2004). Keratin 14 Cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein. *Genesis* 38, 176-181.
- Hart, P. H.**, Cooper, R. L., and Finlay-Jones, J. J. (1991). IL-4 suppresses IL-1 beta, TNF-alpha and PGE2 production by human peritoneal macrophages. *Immunology* 72, 344-349.
- Haskill, S.**, Beg, A. A., Tompkins, S. M., Morris, J. S., Yurochko, A. D., Sampson-Johannes, A., Mondal, K., Ralph, P., and Baldwin, A. S., Jr. (1991). Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* 65, 1281-1289.
- Henkel, T.**, Zabel, U., van Zee, K., Muller, J. M., Fanning, E., and Baeuerle, P. A. (1992). Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell* 68, 1121-1133.
- Hennings, H.**, Glick, A. B., Lowry, D. T., Krsmanovic, L. S., Sly, L. M., and Yuspa, S. H. (1993). FVB/N mice: an inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin. *Carcinogenesis* 14, 2353-2358.
- Ho, A. S.**, and Moore, K. W. (1994). Interleukin-10 and its receptor. *Ther Immunol* 1, 173-185.
- Huang, S.**, Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R. M., and Aguet, M. (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259, 1742-1745.
- Indra, A. K.**, Li, M., Brocard, J., Warot, X., Bornert, J. M., Gerard, C., Messaddeq, N., Chambon, P., and Metzger, D. (2000). Targeted somatic mutagenesis in mouse epidermis. *Horm Res* 54, 296-300.
- Ischiropoulos, H.**, Zhu, L., and Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 298, 446-451.
- Ishida-Yamamoto, A.**, Senshu, T., Takahashi, H., Akiyama, K., Nomura, K., and Iizuka, H. (2000). Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. *J Invest Dermatol* 114, 701-705.
- Iwamura, T.**, Caffrey, T. C., Kitamura, N., Yamanari, H., Setoguchi, T., and Hollingsworth, M. A. (1997). P-selectin expression in a metastatic pancreatic tumor cell line (SUIT-2). *Cancer Res* 57, 1206-1212.

- Karin, M.**, and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology* 18, 621-663.
- Kauffman, C. L.**, Aria, N., Toichi, E., McCormick, T. S., Cooper, K. D., Gottlieb, A. B., Everitt, D. E., Frederick, B., Zhu, Y., Graham, M. A., *et al.* (2004). A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis. *J Invest Dermatol* 123, 1037-1044.
- Kirkham N** (2005) Tumors and cysts of the epidermis. In: *Lever's histopathology of the skin* (Elder DE, eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kleyn, C. E.**, and Griffiths, C. E. (2006). Infliximab for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Biol Ther* 6, 797-805.
- Koga,T.**, Duan, H., Urabe, K., and Furue, M. (2002). In situ localization of CD83-positive dendritic cells in psoriatic lesions. *Dermatology* 204, 100-103.
- Korstanje, M. J.**, and Bessems, P. J. (1991). Incontinentia pigmenti with hyperkeratotic lesions in adulthood and possible squamous cell carcinoma. *Dermatologica* 183, 234-236.
- Krueger, G.**, Koo, J., Lebwohl, M., Menter, A., Stern, R. S., and Rolstad, T. (2001). The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey.[see comment]. *Archives of Dermatology* 137, 280-284.
- Krueger, G. G.**, Jederberg, W. W., Ogden, B. E., and Reese, D. L. (1978). Inflammatory and immune cell function in psoriasis: II. Monocyte function, lymphokine production. *J Invest Dermatol* 71, 195-201.
- Krueger, G. G.**, Papp, K. A., Stough, D. B., Loven, K. H., Gulliver, W. P., and Ellis, C. N. (2002). A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study evaluating efficacy and tolerability of 2 courses of alefacept in patients with chronic plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 47, 821-833.
- Kumar, A.**, Takada, Y., Boriek, A. M., and Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J Mol Med* 82, 434-448.
- Kupper, T. S.** (1988). Interleukin 1 and other human keratinocyte cytokines: molecular and functional characterization. *Adv Dermatol* 3, 293-307.
- Kupper, T. S.** (1990). Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *J Clin Invest* 86, 1783-1789.
- Kupper, T. S.**, Chua, A. O., Flood, P., McGuire, J., and Gubler, U. (1987). Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J Clin Invest* 80, 430-436.

- Kupper, T. S.**, Min, K., Sehgal, P., Mizutani, H., Birchall, N., Ray, A., and May, L. (1989). Production of IL-6 by keratinocytes. Implications for epidermal inflammation and immunity. *Ann N Y Acad Sci* 557, 454-464; discussion 464-455.
- Larsen, C. G.**, Anderson, A. O., Appella, E., Oppenheim, J. J., and Matsushima, K. (1989). The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243, 1464-1466.
- Larsen, C. G.**, Anderson, A. O., Oppenheim, J. J., and Matsushima, K. (1989). Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 68, 31-36.
- Le Bail, O.**, Schmidt-Ullrich, R., and Israel, A. (1993). Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. *EMBO Journal* 12, 5043-5049.
- Lee, E.**, Trepicchio, W. L., Oestreicher, J. L., Pittman, D., Wang, F., Chamian, F., Dhodapkar, M., and Krueger, J. G. (2004). Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med* 199, 125-130.
- Lehenkari, P. P.**, Kellinsalmi, M., Napankangas, J. P., Ylitalo, K. V., Monkkonen, J., Rogers, M. J., Azhayevev, A., Vaananen, H. K., and Hassinen, I. E. (2002). Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol* 61, 1255-1262.
- Li, Q.**, Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K. F., and Verma, I. M. (1999). Severe liver degeneration in mice lacking the I kappa B kinase 2 gene.[see comment]. *Science* 284, 321-325.
- Li, Z. W.**, Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999). The IKKbeta subunit of I kappa B kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappa B activation and prevention of apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 189, 1839-1845.
- Lind, M. H.**, Rozell, B., Wallin, R. P., van Hogerlinden, M., Ljunggren, H. G., Toftgard, R., and Sur, I. (2004). Tumor necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-kappa B inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4972-4977.
- Lowes, M. A.**, Chamian, F., Abello, M. V., Fuentes-Duculan, J., Lin, S. L., Nussbaum, R., Novitskaya, I., Carbonaro, H., Cardinale, I., Kikuchi, T., *et al.* (2005). Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19057-19062.

- Majewski, S.**, and Jablonska, S. (1995). Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus-induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol* 131, 1312-1318.
- Makris, C.**, Godfrey, V. L., Krahn-Senftleben, G., Takahashi, T., Roberts, J. L., Schwarz, T., Feng, L., Johnson, R. S., and Karin, M. (2000). Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5, 969-979.
- Mansbridge, J. N.**, and Knapp, A. M. (1987). Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J Invest Dermatol* 89, 253-263.
- Mayo, M. W.**, Wang, C. Y., Cogswell, P. C., Rogers-Graham, K. S., Lowe, S. W., Der, C. J., and Baldwin, A. S., Jr. (1997). Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* 278, 1812-1815.
- McKenzie, R. C.**, and Sauder, D. N. (1990). The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J Invest Dermatol* 95, 105S-107S.
- Mease, P. J.**, Goffe, B. S., Metz, J., VanderStoep, A., Finck, B., and Burge, D. J. (2000). Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 356, 385-390.
- Melton, J. L.**, and Rasmussen, J. E. (1991). Clinical manifestations of human papillomavirus infection in nongenital sites. *Dermatol Clin* 9, 219-233.
- Mercurio, F.**, Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., and Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation.[see comment]. *Science* 278, 860-866.
- Miura, H.**, Sano, S., Higashiyama, M., Yoshikawa, K., and Itami, S. (2000). Involvement of insulin-like growth factor-I in psoriasis as a paracrine growth factor: dermal fibroblasts play a regulatory role in developing psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res* 292, 590-597.
- Mombaerts, P.**, Clarke, A. R., Rudnicki, M. A., Iacomini, J., Itohara, S., Lafaille, J. J., Wang, L., Ichikawa, Y., Jaenisch, R., Hooper, M. L., and et al. (1992). Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature* 360, 225-231.
- Mommers, J. M.**, van Rossum, M. M., van Erp, P. E., and van De Kerkhof, P. C. (2000). Changes in keratin 6 and keratin 10 (co-)expression in lesional and symptomless skin of spreading psoriasis. *Dermatology* 201, 15-20.

- Mortier, L.,** Marchetti, P., Delaporte, E., Martin de Lassalle, E., Thomas, P., Piette, F., Formstecher, P., Polakowska, R., and Danze, P. M. (2002). Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16(INK4a) tumor suppressor. *Cancer Lett* 176, 205-214.
- Mosser, D. M.** (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73, 209-212.
- Mosser, D. M.,** and Handman, E. (1992). Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *J Leukoc Biol* 52, 369-376.
- Mukhopadhyay, A.,** Bueso-Ramos, C., Chatterjee, D., Pantazis, P., and Aggarwal, B. B. (2001). Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene* 20, 7597-7609.
- Munder, M.,** Mallo, M., Eichmann, K., and Modolell, M. (1998). Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 187, 2103-2108.
- Nair, R. P.,** Henseler, T., Jenisch, S., Stuart, P., Bichakjian, C. K., Lenk, W., Westphal, E., Guo, S. W., Christophers, E., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (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.
- Naldi, L.,** Chatenoud, L., Linder, D., Belloni Fortina, A., Peserico, A., Virgili, A. R., Bruni, P. L., Ingordo, V., Lo Scocco, G., Solaroli, C., *et al.* (2005). Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: results from an Italian case-control study.[see comment]. *Journal of Investigative Dermatology* 125, 61-67.
- Neri, A.,** Chang, C. C., Lombardi, L., Salina, M., Corradini, P., Maiolo, A. T., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. (1991). B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50. *Cell* 67, 1075-1087.
- Newman, P. J.** (1997). The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99, 3-8.
- Nickoloff, B. J.** (2000). Characterization of lymphocyte-dependent angiogenesis using a SCID mouse: human skin model of psoriasis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5, 67-73.
- Nickoloff, B. J.,** and Nestle, F. O. (2004). Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *Journal of Clinical Investigation* 113, 1664-1675.

- Nickoloff, B. J.**, Schroder, J. M., von den Driesch, P., Raychaudhuri, S. P., Farber, E. M., Boehncke, W. H., Morhenn, V. B., Rosenberg, E. W., Schon, M. P., and Holick, M. F. (2000). Is psoriasis a T-cell disease? *Exp Dermatol* 9, 359-375.
- Ouchi, N.**, Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., *et al.* (1999). Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100, 2473-2476.
- Pahl, H. L.** (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Palombella, V. J.**, Rando, O. J., Goldberg, A. L., and Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78, 773-785.
- Pasparakis, M.**, Courtois, G., Hafner, M., Schmidt-Supprian, M., Nenci, A., Toksoy, A., Krampert, M., Goebeler, M., Gillitzer, R., Israel, A., *et al.* (2002). TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 417, 861-866.
- Perkins, N. D.**, Schmid, R. M., Duckett, C. S., Leung, K., Rice, N. R., and Nabel, G. J. (1992). Distinct combinations of NF-kappa B subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1529-1533.
- Piguet, P. F.** (1993). TNF and the pathology of the skin. *Res Immunol* 144, 320-326.
- Piskin, G.**, Sylva-Steenland, R. M., Bos, J. D., and Teunissen, M. B. (2006). In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol* 176, 1908-1915.
- Pitarch, G.**, Sanchez-Carazo, J. L., Mahiques, L., Perez-Ferriols, M. A., and Fortea, J. M. (2007). Treatment of psoriasis with adalimumab. *Clin Exp Dermatol* 32, 18-22.
- Pober, J. S.**, Gimbrone, M. A., Jr., Lapierre, L. A., Mendrick, D. L., Fiers, W., Rothlein, R., and Springer, T. A. (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137, 1893-1896.
- Prinz, J. C.** (2004). Neues zur Pathogenese der Psoriasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2, 448-456; quiz 457.
- Qian, Q.**, Jutila, M. A., Van Rooijen, N., and Cutler, J. E. (1994). Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* 152, 5000-5008.

- Rao, K. S.,** Babu, K. K., and Gupta, P. D. (1996). Keratins and skin disorders. *Cell Biol Int* 20, 261-274.
- Rath, P. C.,** and Aggarwal, B. B. (2001). Antiproliferative effects of IFN-alpha correlate with the downregulation of nuclear factor-kappa B in human Burkitt lymphoma Daudi cells. *J Interferon Cytokine Res* 21, 523-528.
- Rechsteiner, M.,** and Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 267-271.
- Reed, S. G. (1999).** TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes Infect* 1, 1313-1325.
- Regnier, C. H.,** Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., and Rothe, M. (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90, 373-383.
- Robert, C.,** and Kupper, T. S. (1999). Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* 341, 1817-1828.
- Rogers, M. J.,** Gordon, S., Benford, H. L., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Monkonen, J., and Frith, J. C. (2000). Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88, 2961-2978.
- Rosmarin, D.,** and Strober, B. E. (2005). The potential of interleukin 12 inhibition in the treatment of psoriasis. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD* 4, 318-325.
- Rothwarf, D. M.,** Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex.[see comment]. *Nature* 395, 297-300.
- Rutschman, R.,** Lang, R., Hesse, M., Ihle, J. N., Wynn, T. A., and Murray, P. J. (2001). Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* 166, 2173-2177.
- Sakai, H.,** Minami, M., Satoh, E., Matsuo, S., and Iizuka, H. (2000). Keratoacanthoma developing on a pigmented patch in incontinentia pigmenti. *Dermatology* 200, 258-261.
- Sano, S.,** Chan, K. S., Carbajal, S., Clifford, J., Peavey, M., Kiguchi, K., Itami, S., Nickoloff, B. J., and DiGiovanni, J. (2005). Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* 11, 43-49.
- Scharffetter-Kochanek, K.,** Lu, H., Norman, K., van Nood, N., Munoz, F., Grabbe, S., McArthur, M., Lorenzo, I., Kaplan, S., Ley, K., *et al.* (1998). Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* 188, 119-131.

- Schebesch, C.**, Kodelja, V., Muller, C., Hakij, N., Bisson, S., Orfanos, C. E., and Goerdts, S. (1997). Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. *Immunology* 92, 478-486.
- Schmidt-Supprian, M.**, Bloch, W., Courtois, G., Addicks, K., Israel, A., Rajewsky, K., and Pasparakis, M. (2000). NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol Cell* 5, 981-992.
- Schon, M.**, Denzer, D., Kubitzka, R. C., Ruzicka, T., and Schon, M. P. (2000). Critical role of neutrophils for the generation of psoriasiform skin lesions in flaky skin mice. *J Invest Dermatol* 114, 976-983.
- Schon, M. P.**, and Boehncke, W. H. (2005). Psoriasis. *N Engl J Med* 352, 1899-1912.
- Schon, M. P.**, Detmar, M., and Parker, C. M. (1997). Murine psoriasis-like disorder induced by naive CD4+ T cells. *Nat Med* 3, 183-188.
- Schubert, C.**, and Christophers, E. (1985). Mast cells and macrophages in early relapsing psoriasis. *Arch Dermatol Res* 277, 352-358.
- Seitz, C. S.**, Lin, Q., Deng, H., and Khavari, P. A. (1998). Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2307-2312.
- Sen, R.**, and Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- Shimizu, T.**, Izumi, H., Oga, A., Furumoto, H., Murakami, T., Ofuji, R., Muto, M., and Sasaki, K. (2001). Epidermal growth factor receptor overexpression and genetic aberrations in metastatic squamous-cell carcinoma of the skin. *Dermatology* 202, 203-206.
- Siebenlist, U.** (1997). NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. *Biochimica et Biophysica Acta* 1332, R7-13.
- Simmons, D. A.**, Kegel, M. F., Scher, R. K., and Hines, Y. C. (1986). Subungual tumors in incontinentia pigmenti. *Arch Dermatol* 122, 1431-1434.
- Smahi, A.**, Courtois, G., Vabres, P., Yamaoka, S., Heuertz, S., Munnich, A., Israel, A., Heiss, N. S., Klauck, S. M., Kioschis, P., *et al.* (2000). Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* 405, 466-472.

- Song, E.**, Ouyang, N., Horbelt, M., Antus, B., Wang, M., and Exton, M. S. (2000). Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 204, 19-28.
- Soriano, P.** (1995). Gene targeting in ES cells. *Annu Rev Neurosci* 18, 1-18.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Springer, T. A.** (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57, 827-872.
- Stein, M.**, Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176, 287-292.
- Steinert, P. M.**, and Liem, R. K. (1990). Intermediate filament dynamics. *Cell* 60, 521-523.
- Sternberg, N.**, and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of Molecular Biology* 150, 467-486.
- Steven, A. C.**, and Steinert, P. M. (1994). Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 2), 693-700.
- Stone, J. P.**, and Wagner, D. D. (1993). P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J Clin Invest* 92, 804-813.
- Sun, S. C.**, Ganchi, P. A., Ballard, D. W., and Greene, W. C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259, 1912-1915.
- Sutterwala, F. S.**, Noel, G. J., Clynes, R., and Mosser, D. M. (1997). Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* 185, 1977-1985.
- Sutterwala, F. S.**, Noel, G. J., Salgame, P., and Mosser, D. M. (1998). Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc gamma receptor type I. *J Exp Med* 188, 217-222.
- Tanaka, M.**, Fuentes, M. E., Yamaguchi, K., Durnin, M. H., Dalrymple, S. A., Hardy, K. L., and Goeddel, D. V. (1999). Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* 10, 421-429.
- Thepen, T.**, van Vuuren, A. J., Kiekens, R. C., Damen, C. A., Vooijs, W. C., and van De Winkel, J. G. (2000). Resolution of cutaneous inflammation after local elimination of macrophages. *Nat Biotechnol* 18, 48-51.

- Tobin, A. M.**, and Kirby, B. (2005). TNF alpha inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Biodrugs* 19, 47-57.
- Tojima, Y.**, Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., *et al.* (2000). NAK is an I kappa B kinase-activating kinase. *Nature* 404, 778-782.
- Tominaga, K.**, Yoshimoto, T., Torigoe, K., Kurimoto, M., Matsui, K., Hada, T., Okamura, H., and Nakanishi, K. (2000). IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol* 12, 151-160.
- Toruniowa, B.**, and Jablonska, S. (1988). Mast cells in the initial stages of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 280, 189-193.
- Traenckner, E. B.**, Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. (1995). Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO Journal* 14, 2876-2883.
- Trembath, R. C.**, Clough, R. L., Rosbotham, J. L., Jones, A. B., Camp, R. D., Frodsham, A., Browne, J., Barber, R., Terwilliger, J., Lathrop, G. M., and Barker, J. N. (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.**, and Dorner, A. J. (1998). The therapeutic utility of Interleukin-11 in the treatment of inflammatory disease. *Expert Opin Investig Drugs* 7, 1501-1504.
- Trepicchio, W. L.**, Ozawa, M., Walters, I. B., Kikuchi, T., Gilleaudeau, P., Bliss, J. L., Schwertschlag, U., Dorner, A. J., and Krueger, J. G. (1999). Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I cytokine proinflammatory pathways in psoriasis lesions. *J Clin Invest* 104, 1527-1537.
- Tsao, H.** (2001). Genetics of nonmelanoma skin cancer. *Arch Dermatol* 137, 1486-1492.
- Tscharntke M.**, Pofahl R., Chrostek-Grashoff A., Smyth N., Niessen C., Niemann C., Hartwig B., Herzog V., Klein H. W., Krieg T., Brakebusch C., and Haase I. (2007). Impaired epidermal wound healing in vivo upon inhibition or deletion of Rac1. *J. Cell. Sci.*, in press.
- van den Oord, J. J.**, and de Wolf-Peeters, C. (1994). Epithelium-lining macrophages in psoriasis. *Br J Dermatol* 130, 589-594.
- van Hogerlinden, M.**, Rozell, B. L., Ahrlund-Richter, L., and Toftgard, R. (1999). Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res* 59, 3299-3303.

- van Hogerlinden, M.**, Rozell, B. L., Toftgard, R., and Sundberg, J. P. (2004). Characterization of the progressive skin disease and inflammatory cell infiltrate in mice with inhibited NF-kappaB signaling. *J Invest Dermatol* 123, 101-108.
- Van Rooijen, N.**, and Sanders, A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174, 83-93.
- Vanscott, E. J.**, and Ekel, T. M. (1963). Kinetics Of Hyperplasia In Psoriasis. *Arch Dermatol* 88, 373-381.
- Vasioukhin, V.**, Degenstein, L., Wise, B., and Fuchs, E. (1999). The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8551-8556.
- Vassar, R.**, Rosenberg, M., Ross, S., Tyner, A., and Fuchs, E. (1989). Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 1563-1567.
- Walz, G.**, Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M., and Seed, B. (1990). Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250, 1132-1135.
- Wang, C.**, Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., and Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.
- Wang, H.**, Peters, T., Kess, D., Sindrilaru, A., Oreshkova, T., Van Rooijen, N., Stratis, A., Renkl, A. C., Sunderkotter, C., Wlaschek, M., *et al.* (2006). Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. *J Clin Invest* 116, 2105-2114.
- Weber-Matthiesen, K.**, and Sterry, W. (1990). Organization of the monocyte/macrophage system of normal human skin. *J Invest Dermatol* 95, 83-89.
- Weber, B. P.**, Fierlbeck, G., and Kempf, H. G. (1994). Multiple metachronous skin squamous cell carcinomas and epidermodysplasia verruciformis in the head region: a human papilloma virus-associated disease. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 251, 342-346.
- Wollenberg, A.**, Mommaas, M., Oppel, T., Schottdorf, E. M., Gunther, S., and Moderer, M. (2002). Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 118, 327-334.

- Woodworth, C. D.,** Michael, E., Smith, L., Vijayachandra, K., Glick, A., Hennings, H., and Yuspa, S. H. (2004). Strain-dependent differences in malignant conversion of mouse skin tumors is an inherent property of the epidermal keratinocyte. *Carcinogenesis* 25, 1771-1778.
- Woronicz, J. D.,** Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., and Goeddel, D. V. (1997). I κ B kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with I κ B kinase-alpha and NIK.[see comment]. *Science* 278, 866-869.
- Wrone-Smith, T.,** and Nickoloff, B. J. (1996). Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 98, 1878-1887.
- Yamaoka, S.,** Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., and Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93, 1231-1240.
- Ye, C.,** Kiriyaama, K., Mistuoka, C., Kannagi, R., Ito, K., Watanabe, T., Kondo, K., Akiyama, S., and Takagi, H. (1995). Expression of E-selectin on endothelial cells of small veins in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 61, 455-460.
- Younes, A.,** Garg, A., and Aggarwal, B. B. (2003). Nuclear transcription factor-kappaB in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 44, 929-935.
- Young, H. A.** (1996). Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 16, 563-568.
- Zabel, U.,** and Baeuerle, P. A. (1990). Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 61, 255-265.
- Zandi, E.,** Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997). The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for I κ B phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91, 243-252.
- Zenz, R.,** Eferl, R., Kenner, L., Florin, L., Hummerich, L., Mehic, D., Scheuch, H., Angel, P., Tschachler, E., and Wagner, E. F. (2005). Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* 437, 369-375.
- zur Hausen, H.** (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288, F55-78.

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 Prof. Dr. Jens Brüning betreut worden.

Athanasios Stratis

Teilpublikationen:

Stratis, A., Pasparakis, M., Markur, D., Knaup, R., Pofahl, R., Metzger, D., Chambon, P., Krieg, T., and Haase, I. (2006). Localized inflammatory skin disease following inducible ablation of I kappa B kinase 2 in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 126, 614-620.

Stratis, A., Pasparakis, M., Rupec, R. A., Markur, D., Hartmann, K., Scharffetter-Kochanek, K., Peters, T., van Rooijen, N., Krieg, T., and Haase, I. (2006). Pathogenic role for skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 116, 2094-2104.

Wang, H., Peters, T., Kess, D., Sindrilaru, A., Oreshkova, T., Van Rooijen, N., Stratis, A., Renkl, A. C., Sunderkotter, C., Wlaschek, M., *et al.* (2006). Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. *J Clin Invest* 116, 2105-2114.

L E B E N S L A U F

Persönliche Daten:

Name: Stratis
Vorname: Athanasios
Geburtsdatum: 19.05.1974
Geburtsort: Oldenburg (i.O.)
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Griechisch

Schulbildung:

08/1980 – 07/1984 Katholische Grundschule Hude
08/1984 – 07/1986 Orientierungsstufe Hude
08/1986 – 07/1991 Realschulzweig der Paulusschule Oldenburg,
Abschluss: Erweiterter Sekundarabschluss I
08/1991 – 07/1995 Gymnasium Liebfrauenschule Oldenburg
Abschluss: Abitur

Hochschulstudium:

10/1995 – 01/2002 Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik
Abschluss: Diplom Biologe
02/2002 - 06/2007 Klinikum der Universität zu Köln
vor Abgabe Abschluss: Dr. rer. nat.
Fach: Genetik

Diplomarbeit:

Zyto- und genotoxische Kombinationswirkung von
oxidativem Stress und komplexen
Umweltchemikaliengemischen auf menschliche Fibroblasten
Schwerpunkt: Biochemie

Doktorarbeit:

Die pathogene Rolle der Hautmakrophagen in einem
Mausmodell mit einer Keratinozyten-induzierten und
TNF-vermittelten Psoriasis-ähnlichen Hautentzündung

Danksagung:

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Ingo Haase für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sowie für die Betreuung und Diskussion der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln.

Herrn Prof. Dr. Jens Brüning danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät und für die Übernahme des Erstgutachtens. Frau Priv.-Doz. Dr. Roswitha Nischt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Doreen Markur möchte ich besonders für die Unterstützung bei einem Teil der Versuche, für ihre Diskussionsbereitschaft und das angenehme Laborklima danken.

Des weiteren möchte ich mich bei den Kollegen und Kolleginnen Ruth Pofahl, Michael Tschardt, Renate Knaup, Semra Frimpong, Alina Hedrych-Ozimina, Kerstin Wodecki und Christina Schaffrath für ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Kijawasch Shah Hosseini danke ich für viele gute Ratschläge.

Für das gute Arbeitsklima bedanke ich mich auch bei den Kollegen und Kolleginnen Anke Klose, Yvonne Meyer, Benedikt Hartwig, Nicole Brüggel, Jan Zamek, Astrid Willbrandt-Hennes, Kerstin Elias und Miriam Grosse Hovest.

Ganz besonders herzlich danke ich meiner Familie (Leonidas, Katherina, Stella und Georgios Stratis) für die jahrelange moralische und finanzielle Unterstützung, sowie meiner Freundin Yvonne Lüke.