

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

- Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf -

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. I. Moll

Interaktion von Entzündungszellen mit Tight Junction Proteinen in der Psoriasis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Melanie Sylvia Eisele

aus Müllheim

Hamburg 2014

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.01.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Frau Prof. Dr. I. Moll

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Frau Prof. Dr. J. Brandner

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Frau Prof. Dr. E. Tolosa

Meinen Kindern

Julia und Moritz

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG - GRUNDLAGEN UND STAND DER FORSCHUNG	1
1.1	PSORIASIS	1
1.1.1	Definition und Klinik	1
1.1.2	Epidemiologie und Genetik	1
1.1.3	Histologie	2
1.2	BEDEUTUNG DER T-LYMPHOZYTEN IN DER PATHOGENESE DER PSORIASIS	3
1.2.1	Zytotoxische T-Zellen	4
1.2.2	T-Helferzellen	4
1.2.3	Regulatorische T-Zellen	5
1.2.4	Besonderheiten in Lokalisation und Verteilung von Immunzellen in psoriatischer Haut	7
1.3	TIGHT JUNCTIONS – FUNKTION UND AUFBAU	7
1.3.1	Das Plaque-Protein ZO1	9
1.3.2	Occludin	9
1.3.3	Claudin-1	10
1.3.4	Coxsackie- and Adenovirus-Receptor (CAR)	11
1.3.5	Junctional Adhesion Molecule-like (JAML)	12
1.3.6	Veränderungen der Tight Junction-Proteine durch Zellen des Immunsystems und durch Zytokine	15
2	ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	18
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	MATERIAL	19
3.1.1	Untersuchungsgut	19
3.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3	Chemikalien	21
3.1.4	Puffer und Lösungen	22
3.1.5	Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen	25
3.1.5.1	Primärantikörper	25
3.1.5.2	Immunglobuline für die Negativkontrollen	26
3.1.5.3	Sekundärantikörper	26
3.2	METHODEN	27
3.2.1	Immunhistochemische Färbungen	27
3.2.1.1	Vorbereiten der Gewebeschnitte	27
3.2.1.2	Immunhistochemische Doppelfärbung	28
3.2.1.3	Immunhistochemische Einzelfärbung auf Folgeschnitten	31
3.2.2	Visualisierung	31
3.2.3	Bildbearbeitung	31
3.2.4	Statistik	31
3.2.5	Bestimmung der Eindringtiefe von Immunzellen	31
3.2.6	Auszählung der CD4- und FoxP3-positiven Zellen	32
3.2.7	Menge der JAML-positiven Zellen	32
4	ERGEBNISSE	33
4.1	INTERAKTION VON ZO1 MIT CD4-, FOXP3- UND CD8-POSITIVEN ZELLEN	33
4.1.1	Interaktion von ZO1 mit CD4-positiven Zellen	33
4.1.2	Interaktion von ZO1 mit FoxP3-positiven Zellen	36
4.1.3	Interaktion von ZO1 mit CD8-positiven Zellen	41

4.2	NICHT GELUNGENE FÄRBUNG MIT IL-17- UND IL-22-ANTIKÖRPERN	44
4.3	INTERAKTION VON CLAUDIN-1 MIT CD4- UND FOXP3-POSITIVEN ZELLEN	45
4.3.1	<i>Interaktion von Claudin-1 mit CD4-positiven Zellen</i>	46
4.3.2	<i>Interaktion von Claudin-1 mit FoxP3-positiven Zellen</i>	49
4.4	INTERAKTION VON OCCLUDIN MIT CD4- UND FOXP3-POSITIVEN ZELLEN	53
4.4.1	<i>Expression von Occludin in den Gewebeproben</i>	53
4.4.2	<i>Interaktion von Occludin mit CD4-positiven Zellen</i>	53
4.4.3	<i>Interaktion von Occludin mit FoxP3-positiven Zellen</i>	56
4.5	EXPRESSION VON CAR IN GESUNDER UND PSORIATISCHER HAUT UND SEINE INTERAKTION MIT JAML-POSITIVEN ZELLEN	60
5	DISKUSSION	66
5.1	FÜR DIE PATHOGENESE DER PSORIASIS RELEVANTE TIGHT JUNCTION-PROTEINE	66
5.2	INTERAKTIONEN ZWISCHEN TIGHT JUNCTION-PROTEINEN UND IMMUNZELLEN UND IHRE MÖGLICHE BEDEUTUNG	67
5.2.1	<i>Interaktion der T-Lymphozyten mit ZO1</i>	67
5.2.2	<i>Interaktion der T-Lymphozyten mit Claudin-1</i>	69
5.2.3	<i>Interaktion der T-Lymphozyten mit Occludin</i>	70
5.3	LOKALISATION UND EXPRESSIONSMUSTER VON CAR	71
6	ZUSAMMENFASSUNG	74
7	LITERATURVERZEICHNIS	76
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
9	TABELLENVERZEICHNIS	96
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	96
11	ANHANG	I
11.1	DANKSAGUNG	I
11.2	LEBENS LAUF	II
11.3	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	III

1 Einleitung - Grundlagen und Stand der Forschung

1.1 Psoriasis

1.1.1 Definition und Klinik

Die Psoriasis ist eine gutartige, chronisch schubweise verlaufende inflammatorische Dermatose (Kempf et al., 2011), die sich in scharf begrenzten erythemato-squamösen Plaques äußert. Es werden verschiedene Psoriasis-Formen unterschieden. Die häufigste Form ist die Psoriasis vulgaris, die sich weiterhin in Typ I mit früher Manifestation (Altersgipfel der Erstmanifestation liegt bei Frauen bei 16 und bei Männern bei 21 Jahren), hoher familiärer Belastung und hoher Kopplung mit bestimmten HLA-Typen, vor allem HLA-Cw6 (Henseler and Christophers, 1985) und in Typ II mit später Manifestation (>50 Jahre) und ohne familiäre Häufung unterteilt. Mit einer Häufigkeit von 20% folgt die Psoriasis arthropathica, die vor allem durch ihren Gelenkbefall imponiert, und mit bis zu 2,5% die pustelbildende Psoriasis pustulosa (Moll, 2010).

1.1.2 Epidemiologie und Genetik

Weltweit sind 1,5-3% der Bevölkerung von Psoriasis betroffen, in Deutschland liegt die Prävalenz bei 2,0%, dies entspricht in absoluten Zahlen bundesweit etwa 2 Millionen betroffenen Menschen (Schafer et al., 2011, Augustin et al., 2011). Die Prävalenz in Europa schwankt nur gering zwischen den verschiedenen Ländern (Christophers, 2001). In den USA liegt die Prävalenz bei 4,6% (Mitchell, 1967), aber nur 0,7% unter den Afroamerikanern. Erwartungsgemäß findet sich eine niedrigere Prävalenz in Afrika (0,7%), Indien (0,7%) und auch China (0,4%) (Christophers, 2001). Im Gegensatz zu anderen Autoimmunerkrankungen sind Frauen nicht häufiger von Psoriasis betroffen als Männer, allerdings erkranken Frauen häufiger in jüngerem Alter (Henseler and Christophers, 1985).

Bei der Psoriasis spielt die genetische Disposition eine große Rolle (Sabat et al., 2007). Zu dieser Sichtweise führten drei verschiedene Beobachtungen. Zum einen steigt die Wahrscheinlichkeit an Psoriasis zu erkranken, wenn Verwandte ersten Grades ebenfalls erkrankt sind (Schon and Boehncke, 2005, Watson et al., 1972), des Weiteren ist die Psoriasis mit verschiedenen HLA-Typen assoziiert wie HLA-Cw6, HLA-B13, HLA-B17, HLA-Bw57 und HLA-DR4 (Schon and Boehncke, 2005, Christophers, 2001) und drittens sind verschiedene spezifische prädisponierende Gene bekannt (z.B. PSORS 1-

10). Des Weiteren finden sich auch Verbindungen zu Genregionen, die in inflammatorische Signaltransduktionswege involviert sind (Nogralles et al., 2010), beispielsweise der IL-23-Signalweg und der NFκB-Signalweg (Nair et al., 2008, Nair et al., 2009, Cargill et al., 2007). Weitere Verbindungen finden sich zu Genen der epidermalen Abwehr, die bei Psoriasis-Patienten überexprimiert sind (de Cid et al., 2009). Allerdings erkranken beispielsweise nur 10% der heterozygoten und 20-30% der homozygoten HLA-Cw6-Träger an Psoriasis (Gudjonsson et al., 2003), was zur Annahme zwingt, dass die genetische Disposition multifaktoriell ist.

1.1.3 Histologie

Die Psoriasis ist eine immunologisch induzierte, überschießende Reaktion in der Haut (Sabat et al., 2007). Die Frühform der Psoriasis ist gekennzeichnet durch die Dilatation von Blutgefäßen und die Migration von mononukleären Zellen und Granulozyten zuerst in die Dermis und danach in die Epidermis (Kirschner et al., 2009). Des Weiteren zeigen sich weitere Merkmale der Psoriasis wie eine leichte regelmäßige Akanthose, einige elongierte Reteleisten und eine suprapillär verschmälerte Epidermis. Das Stratum granulosum ist verschmälert oder fehlt komplett (Pötzl, 2010).

Das typische histologische Erscheinungsbild der Spätform der Psoriasis (Plaque-Typ) ist eine gleichförmige Akanthose mit stark elongierten Reteleisten bis ins Stratum papillare. Da die mit bis zu 10facher Geschwindigkeit proliferierenden Keratinozyten nicht ausreifen, kommt es zur Hyperparakeratose im Stratum corneum (Weinstein et al., 1985). Des Weiteren zeigt sich ein fokaler Verlust des Stratum granulosums (Kempf et al., 2011). Die Epidermis über den verlängerten Papillarkörpern besteht nur aus wenigen abgeflachten Keratinozytenschichten. In diesen Papillarkörpern finden sich ektatische, geschlängelte Kapillaren, die im klinischen Erscheinungsbild die Erytheme verursachen (Nogralles et al., 2010). Um die dilatierten Blutgefäße findet sich das mononukleäre Infiltrat. Typisch sind die Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten als Munro'sche Mikroabszesse im Bereich hyperparakeratotischer Verhornung und als unilokuläre spongiforme Kogoj-Pusteln im Stratum spinosum (Kempf et al., 2011).

1.2 Bedeutung der T-Lymphozyten in der Pathogenese der Psoriasis

T-Lymphozyten gehören zu den Leukozyten, die im Knochenmark gebildet und anschließend in den lymphatischen Organen geprägt werden. Die Gruppe der T-Zellen lässt sich unterteilen in zytotoxische T-Zellen, T-Helfer-, T-Regulator- und T-Gedächtniszellen.

Im Drei-Phasen-Modell nach Sabat et al. (Sabat et al., 2007) tragen zu verschiedenen Zeitpunkten verschiedene Zelltypen zum Erscheinungsbild der Psoriasis bei. Nach diesem Modell wird die Entstehung der Psoriasis in drei Phasen eingeteilt: die Sensibilisierungsphase, der eine „stille Phase“ folgt, und die sich daran anschließende Effektorphase, in der sich die Erkrankung klinisch manifestiert. In der Sensibilisierungsphase, der ersten der drei Phasen, entwickeln sich aus naiven T-Zellen spezifische Effektor-Th1- und Th17-Zellen, die dann in den späteren Phasen in die Haut migrieren und durch Aktivierung weiterer Immunzellen das klinische Hautbild hervorrufen (Sabat et al., 2007). Diese erste Phase der T-Zell-Differenzierung findet in sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten oder Tonsillen statt. Der initiale Schritt wird durch das Erkennen und die Aufnahme von Antigenen durch unreife dendritische Zellen eingeleitet. Diese Zellen migrieren nun in die T-Zell-Regionen der sekundären lymphatischen Organe, wo sie die Antigene über MHC-Klasse-II-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche präsentieren. Diese MHC-II-Peptidkomplexe können von CD4-positiven T-Zellen mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors erkannt werden. Dendritische Zellen haben aber auch noch die Fähigkeit diese Antigene über MHC-I-Rezeptoren zu präsentieren, was zur zusätzlichen Aktivierung der CD8-positiven T-Zellen führt.

Welche Faktoren letztendlich zur massiven Proliferation der Keratinozyten und damit zum klinischen Erscheinungsbild der Psoriasis führen, ist nicht vollständig geklärt. Zumindest teilweise jedoch scheinen die T-Zellen dafür verantwortlich zu sein. So konnte gezeigt werden, dass sowohl aktivierte wie nicht-aktivierte T-Zellen Faktoren produzieren, die zu vermehrter Keratinozytenproliferation führen (Hancock et al., 1988). Auch können CD4⁺-Zellen, die aus psoriatischen Plaques isoliert wurden, über lösliche Faktoren die Proliferation von Keratinozyten fördern, auch bei normalerweise ruhenden Basalzellen (Bata-Csorgo et al., 1995). Neben den T-Zellen tragen weitere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten (Rogalski et al., 2002), Makrophagen

(Stratis et al., 2006, Wang et al., 2006) und auch Fibroblasten zur überschießenden Zellproliferation der Keratinozyten bei. Jedoch induzieren auch die Keratinozyten selbst, beispielsweise über die Produktion von TGF- α , ihre eigene Proliferation (Valyi-Nagy et al., 1992, Coffey et al., 1987, Schultz et al., 1987).

1.2.1 Zytotoxische T-Zellen

Die zytotoxischen T-Zellen, die das Oberflächenprotein CD8 tragen, haben die Aufgabe viral infizierte Zellen und Tumorzellen zu zerstören. Diese Zellen werden aktiviert durch die Bindung von Antigen, welches auf MHC-Klasse I-Molekülen durch Antigenpräsentierende Zellen, vor allem dendritische Zellen, präsentiert wird. Aktivierte CD8⁺-Zellen erkennen dann ihre Ziel-Zellen ebenfalls über den MHC-I-Antigen-Komplex. CD8⁺-Zellen können durch von regulatorischen T-Zellen sezernierte Moleküle wie IL-10 und Adenosin inaktiviert werden.

Sowohl in psoriatischen Plaques als auch im peripheren Blut der Psoriasis-Patienten findet sich ein signifikanter Zuwachs an CD8⁺-Zellen (Prpic-Massari and Kastelan, 2009). Diese könnten stimuliert werden durch die zahlreich vorkommenden CD4⁺-Zellen, die Th1-Zytokine wie IFN- γ und TNF- α sezernieren (Schlaak et al., 1994, Vollmer et al., 2001). Die stark vermehrt vorkommenden CD8⁺-Zellen erscheinen bereits sehr früh am Rand psoriatischer Läsionen (Vissers et al., 2004), scheinen aber auch während der chronischen Phase relevant zu sein. Sie werden bei Psoriatikern vor allem in der Epidermis, weniger in der Dermis gefunden (Valdimarsson et al., 1995).

1.2.2 T-Helferzellen

Die T-Helferzellen, welche das Oberflächenprotein CD4 tragen, unterstützen andere Zellen in immunologischen Prozessen wie zum Beispiel bei der Reifung der B-Zellen zur Plasmazelle oder Memory-B-Zelle oder bei der Aktivierung von Makrophagen. Nach der Aktivierung der CD4⁺-Zellen durch Antigene, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen von Antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden, teilen sie sich schnell und produzieren Zytokine, die die aktive Immunantwort regulieren. CD4⁺-Zellen können in verschiedene Untergruppen wie Th1, Th2 oder Th17 unterteilt werden. In der Entstehung der Psoriasis wird den CD4⁺-Zellen eine besondere Bedeutung zugemessen, da der Ausbruch psoriatischer Läsionen mit der Aktivierung und dem Einstrom CD4⁺-T-Zellen in die Epidermis verbunden ist (Baker et al., 1984, Onuma, 1994).

Die sowohl in psoriatischen Plaques als auch im Blut von Psoriasis-Patienten gefundenen CD4-positiven T-Zellen gehören überwiegend zu den Th1-Zellen mit dem entsprechenden Zytokin-Expressionsmuster: INF- γ , IL-2 und TNF- α (Schlaak et al., 1994, Austin et al., 1999).

Von großer Bedeutung für die Entstehung der Psoriasis ist die Ausdifferenzierung der CD4-positiven T-Zelle zur Th17-Zelle. Bei Vorhandensein von IL-6 und TGF- β wird der Rezeptor für IL-23 hochreguliert, wodurch die Th0-Zelle zur Th17-Zelle ausdifferenziert. Die Bedeutung dieses Differenzierungsweges wird durch die Erkenntnis unterstrichen, dass Polymorphismen in einzelnen Nukleotiden des IL-23-Rezeptors mit Psoriasis assoziiert sind (Cargill et al., 2007). Die Th17-Zelle wiederum produziert IL-6, IL-17 und IL-22. Unter den T-Zell-Zytokinen zeigen in psoriatischen Läsionen IL-17 und IL-22 die höchste Expression (Kunz et al., 2006, Wolk et al., 2004). IL-22 konnte im Blut von Psoriasis-Patienten nachgewiesen und dessen Konzentration mit der Schwere der Erkrankung korreliert werden (Wolk et al., 2006). Als Hauptquelle dieser hohen IL-22-Sekretion werden die Th17- und Th1-Zellen verantwortlich gemacht (Wolk et al., 2002, Chung et al., 2006, Liang et al., 2006). Ebenso wurden in psoriatischen Läsionen erhöhte Mengen an IL-17 gefunden (Chan et al., 2006) und zwar in derselben Größenordnung wie IL-22 (Kunz et al., 2006, Sabat et al., 2007).

Das von den Th17-Zellen ebenfalls sezernierte IL-6 (Grossman et al., 1989) fördert, ebenso wie IL-8 (Tuschil et al., 1992), die Proliferation der Keratinozyten (Ghoreschi et al., 2007).

1.2.3 Regulatorische T-Zellen

Die regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) können in zwei Klassen unterteilt werden, nämlich den natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (naturals T_{regs} , nT_{regs}) und den induzierbaren regulatorischen T-Zellen (iT_{regs}). Vor allem nT_{regs} , aber auch eine Subpopulation der iT_{regs} , exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3. Sie können durch den Nachweis von Kombinationen von Molekülen (z.B. nT_{regs} durch $CD4^+CD25^+FoxP3^+$) identifiziert werden. Die Hauptaufgaben regulatorischer T-Zellen bestehen in der Herunterregulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort und in der Unterdrückung autoreaktiver T-Zellen. Die regulatorischen T-Zellen sind verantwortlich für die Limitierung der Immunantwort beispielsweise durch die Produktion von immunsupprimierenden Zytokinen wie IL-10 und TGF- β . Obwohl FoxP3⁺-Zellen in

psoriatischer Haut reichlich vorkommen (Fujimura et al., 2008) – in gesunder Haut sind sie selten – ist ihr Anteil gemessen an allen T-Zellen in psoriatischer Haut niedriger als in gesunder Haut. Allerdings ist dies nur im Stadium des Voranschreitens der Krankheit der Fall, im stabilen Zustand oder in der Phase des Rückgangs der Läsionen ist das Verhältnis zwischen T_{regs} zu allen T-Zellen dem gesunder Haut gleich (Chen et al., 2008). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der reduzierte Anteil FoxP3^+ -Zellen der Antrieb für das Voranschreiten der Erkrankung sein könnte. Dies wird unterstützt durch die Erkenntnis, dass Patienten mit Psoriasis, die mit TNF-Biologicals behandelt werden, eine Heraufregulation von $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ - T_{regs} als Frühmarker des Ansprechens auf die Therapie aufweisen (Quaglino et al., 2009). Das Missverhältnis zwischen T_{regs} und T-Zellen insgesamt wird noch dadurch unterstützt, dass die funktionelle Kapazität der T_{reg} -Zellen im Hinblick auf ihre Fähigkeit, andere T-Zellen zu supprimieren, in der Psoriasis beeinträchtigt ist (Sugiyama et al., 2005). Ursache dieser Beeinträchtigung könnte die Kombination an hohen Leveln von IL-6 in psoriatischer Haut und der erhöhten Expression von IL-6-Rezeptoren auf der Oberfläche von in Haut lokalisierten FoxP3^+ -Zellen sein (Goodman et al., 2009). Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der FoxP3^+ -Zellen könnte wichtige Zellfunktionen blockieren. Dieser Effekt wird dadurch verstärkt, dass IL-6 den Widerstand der Effektor-T-Zellen gegenüber der Suppression durch T_{regs} erhöht (Pasare and Medzhitov, 2003). Bovenschen und Mitarbeiter fanden heraus, dass psoriatische FoxP3^+ -Zellen bei Hinzugabe psoriasistypischer Zytokine zu IL-17-produzierenden Zellen differenzieren. Diese IL-17 produzierenden Zellen halten die chronische autoimmune Entzündung aufrecht. Normalerweise halten T_{regs} eine strenge Balance zwischen den Transkriptionsfaktoren FoxP3 und ROR γ t aufrecht. Im psoriatischen Milieu, also im Beisein der Zytokine IL-2, IL-15, IL-1 β und IL-23, kommt es aber zu einer erhöhten Expression von ROR γ t in den T_{regs} , was zu einem Abfall von FoxP3 und einem Anstieg von IL-17-produzierenden T-Zellen führt. Als hauptverantwortlich für die Umwandlung zu IL-17-produzierenden T-Zellen wird das Zytokin IL-23 gesehen. Es existieren aber auch Zellen, die eine Koexpression aus FoxP3 und ROR γ t zeigen, was zur Annahme berechtigt, dass eine Rückumwandlung der IL-17-produzierenden Zellen zu reinen FoxP3^+ -Zellen möglich ist. Weiterhin konnten Bovenschen und Mitarbeiter zeigen, dass unter Zugabe des Histon/Protein Deacetylase Inhibitors

Trichostatin-A die Umwandlung der FoxP3⁺-T_{regs} in FoxP3-ROR γ t-positive IL-17-produzierende-T_{regs} blockiert werden kann (Bovenschen et al., 2011).

1.2.4 Besonderheiten in Lokalisation und Verteilung von Immunzellen in psoriatischer Haut

Psoriatische Läsionen zeigen eine höhere Gesamtzellzahl an Immunzellen im Vergleich zu gesunder Haut (Loves et al., 2005, Bjerke et al., 1978). Auch Haut von Psoriasis-Patienten, die klinisch keine Läsionen zeigt, weist eine höhere Anzahl von T-Zellen auf als gesunde Haut (Loves et al., 2005).

In psoriatischen Plaques finden sich CD4-positive Zellen vor allem in der Dermis und CD8-positive Zellen vor allem in der Epidermis (Bos et al., 1987, Bovenschen et al., 2005). Dies könnte durch die Expression unterschiedlicher Chemokinrezeptoren und unterschiedlicher Integrine bedingt sein.

1.3 Tight Junctions – Funktion und Aufbau

Tight Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die zur Barrierefunktion von Zellschichten beitragen, indem sie den parazellulären Fluss von Molekülen und Ionen, und somit den Flüssigkeitsverlust (Simpson et al., 2011, Niessen, 2007), kontrollieren (Anderson, 2001, Anderson and Van Itallie, 1995). Die als Transepithelialer elektrischer Widerstand (TER) gemessene Dichtigkeit der Tight Junction-Stränge für Ionen, aber auch die Permeabilität für größere und kleinere Moleküle, variiert gewebspezifisch und ist abhängig vom Typ und Expressionslevel der TJ-Protein-Familie der Claudine und der qualitativen Zusammensetzung der Tight Junctions (Schneeberger and Lynch, 1992, Inai et al., 1999, Colegio et al., 2003, Stevenson and Keon, 1998). Zusätzlich zur wichtigen Barrierefunktion konnten in Zylinderepithelien weitere Funktionen von TJs beschrieben werden. So trennen sie die Zellmembran in einen apikalen und einen basolateralen Bereich (Hurd et al., 2003, Lemmers et al., 2004, Qin et al., 2005), wodurch sie die Bildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität bewirken (Schneeberger and Lynch, 2004, Aijaz et al., 2006, Shin et al., 2006). TJ-assoziierte Proteine sind aber auch an der Regulation der epithelialen Zellproliferation und Differenzierung und am Vesikeltransport beteiligt (Matter et al., 2005).

In Keratinozyten bzw. in der Haut konnten bisher eine Barrierefunktion von TJs (Furuse et al., 2002, Kirschner et al., 2010, Helfrich et al., 2007, Kirschner et al., 2013) und ein Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation (Kirschner et al., 2012, Kirschner and

Brandner, 2012, Rachow et al., 2013) gezeigt werden. Auch wurde ein Einfluss auf die Polarität postuliert (Niessen et al., 2012).

In der Gefrierbruchelektronenmikroskopie erscheinen die Tight Junctions als kontinuierliches Netzwerk intramembranal gelegener Partikel, die die Zelle umgürten (Stahelin, 1973, Stahelin, 1974). In Aufnahmen mit dem Transmissions-elektronenmikroskop stellen sich Tight Junctions als enge Kontakte der Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen ohne Interzellularraum als sogenannte *Kissing Points* oder *Sites of Fusion* dar (Tsukita et al., 2001, Sawada et al., 2003). In der Epidermis finden sich diese im Stratum granulosum (Furuse et al., 2002, Brandner et al., 2002).

Funktionelle Tight Junctions (s. Abbildung 1) werden gebildet von Transmembranproteinen wie den TJ-associated MARVEL proteins (TAMPs), zu denen auch Occludin zählt, den Claudinen und den Junctional Adhesion Molecules (JAMs), die eingerüstet werden von Plaque-Proteinen wie ZO1 bis 3, Symplekin, MUPP1 und Cingulin, welche eine Verbindung zwischen Transmembranproteinen und Zytoskelett herstellen. In menschlicher Haut findet man eine Co-Lokalisation aller TJ-Proteine im Stratum granulosum, wo auch die typischen TJ-Strukturen gefunden wurden. Darüber hinaus finden sich aber verschiedene TJ-Proteine auch noch in anderen Schichten (Niessen, 2007, Brandner et al., 2006, Brandner, 2009, Schneeberger and Lynch, 2004).

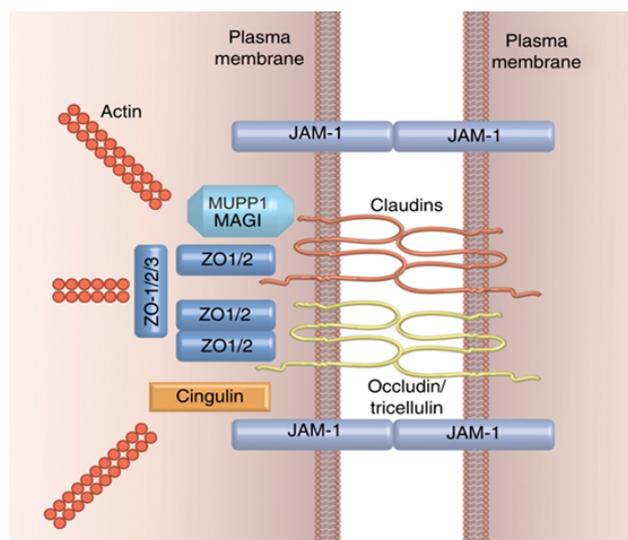


Abbildung 1. Schematische Darstellung der strukturellen Transmembrananteile der Tight Junctions (Niessen, 2007)

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten TJ-Proteine genauer beschrieben:

1.3.1 Das Plaque-Protein ZO1

Das Plaque-Protein ZO1 (Anderson and Van Itallie, 1995) spielt eine Schlüsselrolle in der Struktur und Funktion von Tight Junctions (Stevenson et al., 1986). Es gehört zur Familie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK) (Itoh et al., 1993) und zeichnet sich durch bestimmte homologe Proteinbindungsdomänen aus, über die es Komponenten von Tight Junctions organisiert (Tsukita et al., 1999, Tsukita and Furuse, 1999) und sie mit dem kortikalen Zytoskelett verbindet (Fanning et al., 1998). In Zylinderepithelien ist ZO1 ausschließlich in den Tight Junctions zu finden. Dies kann durch die hohe Affinität des aminoterminalen Endes zu Occludin erklärt werden (Furuse et al., 1994, Fanning et al., 1998). In Geweben ohne Tight Junctions ist ZO1 mit Cadherin in Adhärenzverbindungen co-lokalisert (Itoh et al., 1997, Imamura et al., 1999). ZO1 spielt neben der TJ-Barrierefunktion auch eine Rolle bei Zellproliferation und -differenzierung (Aijaz et al., 2006, Schneeberger and Lynch, 2004, Matter et al., 2005). Eine Rolle von ZO1 bei der Barrierefunktion konnte auch in kultivierten Keratinozyten gezeigt werden (Kirschner et al., 2013).

In gesunder Haut wird ZO1 im Stratum granulosum und auch im oberen Stratum spinosum gefunden. In psoriatischer Haut ist ZO1 sowohl im Frühstadium als auch im psoriatischen Plaque heraufreguliert. Es wird verbreitert exprimiert, d. h. auch in unteren Schichten des Stratum spinosum, und dabei nicht nur an den für Tight Junctions typischen Stellen, sondern auch in der basalen und apikalen Plasmamembran und im Zytoplasma gefunden (Kirschner et al., 2009).

1.3.2 Occludin

Occludin war das erste integrale Membranprotein, welches in Zusammenhang mit Tight Junctions gebracht werden konnte (Furuse et al., 1993, Ando-Akatsuka et al., 1996, Matter and Balda, 1999). Gemeinsam mit den Claudinen bildet es den Strang der Tight Junctions (Fujimoto, 1995). Occludin besteht aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen, einer intrazellulären Schleife und zwei Zytoplasmatischen Ketten (Furuse et al., 1993). Während die extrazellulären Schleifen die Zell-Zell-Verbindung aufrecht erhalten, ist die C-terminale zytoplasmatische Domäne direkt mit den Tight Junction-Proteinen ZO1 (Furuse et al., 1994), ZO2 (Itoh et al., 1999) und

ZO3 (Haskins et al., 1998) verbunden. Auf diese Weise wird Occludin über ZO1 mit dem Zytoskelett verbunden (Fanning et al., 1998). Darüber hinaus kann Occludin auch direkt mit F-Aktin interagieren (Wittchen et al., 1999). Occludin findet sich nicht nur in Tight Junctions, sondern auch an der basolateralen Membran und in zytoplasmatischen Vesikeln. Dabei zeigt sich, dass nur das in Tight Junctions lokalisierte Occludin phosphoryliert ist, was auf eine Regulierung der Lokalisation durch Phosphorylierung schließen lässt (Sakakibara et al., 1997, Sakaguchi et al., 2002).

Eine Überexpression von Occludin führt zur Erhöhung des Transepithelialen Widerstandes (TER) (McCarthy et al., 1996), wohingegen das Fehlen von Occludin keine Auswirkung auf die Ausbildung der TJ-Stränge hat (Hirase et al., 1997, Moroi et al., 1998, Saitou et al., 1998), was darauf schließen lässt, dass ein anderes Protein in der Lage ist, Occludin in dieser Funktion zu ersetzen. Jedoch bleibt das Fehlen von Occludin in anderen Bereichen nicht folgenlos: Occludin-defiziente Mäuse zeigen eine postnatale Wachstumsretardierung und verschiedene Gewebeveränderungen wie beispielsweise Kalzifizierungen im Gehirn und Veränderungen im Magenepithel und an den Speicheldrüsen (Saitou et al., 2000). Über seine regulatorische Funktion im Rahmen der Tight Junction hinaus ist Occludin an Signaltransduktionsvorgängen, Zellwachstum und –differenzierung beteiligt (Schulzke et al., 2005, Paris et al., 2008). In kultivierten Keratinozyten konnte für Occludin eine Rolle bei der Barrierefunktion, der Zell-Zell-Adhäsion, der Differenzierung und der Apoptose gezeigt werden (Kirschner et al., 2013, Rachow et al., 2013).

In gesunder Haut ist Occludin auf das Stratum granulosum beschränkt. In psoriatischer Haut ist die Expression von Occludin sowohl im Frühstadium als auch in psoriatischen Plaques verbreitert, d. h. es wird auch im oberen Stratum spinosum gefunden. Ebenso wie ZO1 ist Occludin nicht nur in der lateralen, sondern auch in der basalen und apikalen Plasmamembran und im Zytoplasma zu finden (Kirschner et al., 2009).

1.3.3 Claudin-1

Claudin-1 ist Mitglied der Claudin-Familie, einer Proteinfamilie mit bisher 24 identifizierten Mitgliedern. Die Claudine gehören ebenfalls zu den integralen Membranproteinen und bilden gemeinsam mit Occludin den Strang der Tight Junctions (Furuse et al., 1998a). In dem Strang sind Claudine hauptverantwortlich für die Strangformation (Furuse et al., 1998b) und ausschlaggebend für die Dichtigkeit der

Tight Junctions in verschiedenen Epithelien (Furuse and Tsukita, 2006, Anderson et al., 2004). So beeinflussen Veränderungen der Claudin-Expression direkt die parazelluläre größen- und ionenselektive Barriere (Van Itallie et al., 2001, Nitta et al., 2003). Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass eine Nullmutation von Claudin-1 der mit Ichthyosis assoziierten neonatalen sklerosierenden Cholangitis zugrunde liegt (Hadj-Rabia et al., 2004). In der Maus führt der Verlust von Claudin-1 zu einer starken Beeinträchtigung der Hautbarriere, was zum Tod am ersten postnatalen Tag führt. Neben einem Verlust der Barrierefunktion von TJs durch Cldn-1 knock-out bzw. knock-down (Furuse et al., 2002, Kirschner et al., 2013) kommt es auch zu einer Veränderung des Stratum corneums (Kirschner et al., 2013, Sugawara et al., 2013).

Claudin-1 wird in gesunder Haut in allen lebenden Schichten gefunden. Elektronenmikroskopisch konnten vereinzelte Moleküle auch im Stratum corneum nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu ZO1 und Occludin wird Claudin-1 bei Psoriasis herabreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation schon im frühen Stadium der Psoriasis vorhanden ist, allerdings weniger stark ausgeprägt als in den Plaques (Kirschner et al., 2009).

1.3.4 Coxsackie- and Adenovirus-Receptor (CAR)

Neben den oben aufgeführten Proteinen gehören auch Proteine der Immunglobulin-Superfamily zu den Tight Junction-assoziierten Membranproteinen. Diese IgSF-Proteine unterteilen sich in drei Gruppen: JAM, CTX – hierzu gehört auch der Coxsackie-and-Adenovirus-Receptor – und Nectine (Shaw and Huang, 2010). Die Hauptaufgabe dieser IgSF-Proteine besteht darin, die Öffnung der epithelialen Barriere und hierdurch den Durchtritt von Immunzellen hin zum Entzündungsherd zu ermöglichen (Chavakis et al., 2003).

Seinen Namen verdankt CAR der Tatsache, dass er von Adenoviren der Serogruppe 2 und 5 und Coxsackieviren der Gruppe B benutzt wird, um die Gastzelle zu infizieren (Bergelson et al., 1997, Bewley et al., 1999). Bei CAR handelt es sich um ein Transmembranprotein, das zwei extrazelluläre immunglobulinähnliche Domänen enthält (Tomko et al., 1997). Es existieren zwei unterschiedliche Splicevarianten, CAR-1 und CAR-2, die sich lediglich in ihrem C-terminalen Ende unterscheiden (Chen et al., 2003).

In nicht-polarisierten Zellen vermittelt CAR die Aggregation gleicher Zellen und rekrutiert das Tight Junction Protein ZO1 zum Ort des Zell-Zell-Kontaktes (Cohen et al., 2001). In polarisierten Zellen wie in Epithelien ist CAR jedoch gemeinsam mit den Tight Junction-Bestandteilen ZO1 und Occludin (Raschperger et al., 2006) lokalisiert und ist dabei an der Bildung funktioneller Tight Junctions beteiligt. Die Expression von CAR führt hier zu einer verminderten Passage von Makromolekülen und Ionen, eine Überexpression erhöht den transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) (Cohen et al., 2001). Lösliches CAR und Anti-CAR-Antikörper hingegen verhindern die Bildung funktioneller Tight Junctions. CAR ist also ein Teil der Tight Junctions und trägt in dieser Funktion zur funktionellen Barriere hinsichtlich der parazellulären Bewegung löslicher Stoffe bei (Cohen et al., 2001). Darüber hinaus ist es wichtig für die Migration von Immunzellen durch Tight Junctions von Epithelien durch die Interaktion mit JAML (Zen et al., 2005, Shaw and Huang, 2010).

1.3.5 Junctional Adhesion Molecule-like (JAML)

Die Familie der Junctional Adhesion Molecules sind Membranproteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören (siehe Kapitel 1.3.4).

JAML besteht aus zwei extrazellulären immunglobulinähnlichen Domänen, einem transmembranen Segment und einem zytoplasmatischen Schwanz (Moog-Lutz et al., 2003). JAML findet sich nur in Leukozyten. Moog-Lutz et al. fanden JAML-mRNA in Untergruppen hämatopoetischer Stammzellen und in sehr hoher Expression in Granulozyten. Luissint et al. wiesen die Expression von JAML auf Neutrophilen, Monozyten und T-Gedächtniszellen nach (Luissint et al., 2008).

Eine bedeutende Rolle spielt JAML in Interaktion mit dem Coxsackie-and-Adenovirus-Receptor. Die CAR-JAML-Bindung ermöglicht die Migration von Leukozyten und die Aktivierung von $\gamma\delta$ -Zellen (Zen et al., 2005, Luissint et al., 2008, Guo et al., 2009, Witherden et al., 2010).

JAML findet sich auf der Oberfläche von T-Lymphozyten im Komplex mit VLA-4-Integrin. Hier liegt JAML eingebunden in diesen Komplex in seiner monomeren, nicht funktionsfähigen Form vor. Bei diesen VLA-4-exprimierenden Zellen führt die Aktivierung des VLA-4-Integrins zur Dissoziation des JAML-VLA-4-Komplexes und zur Akkumulation von funktionsfähigen JAML-Dimeren. Dieser Zusammenhang lässt

vermuten, dass das Integrin VLA-4 die Funktion von JAML kontrolliert, indem es die Dimerisierung von JAML kontrolliert (Luissint et al., 2008). Diese cis-Dimerisierung von JAML ist notwendig zur Bindung mit CAR. Die Bindung erfolgt letztlich mittels der distal gelegenen Immunglobulinschleife von CAR und der proximal gelegenen Ig-Schleife von JAML (Zen et al., 2005).

Wird JAML dagegen von Neutrophilen exprimiert, so bindet es unabhängig von der Aktivierung des Integrins sofort an den Coxsackie-and-Adenovirus-Receptor CAR (Luissint et al., 2008). Zen et al. entwickelten ein Modell, in dem die transepitheliale Migration von Neutrophilen in mehreren Schritten abläuft: Im ersten Schritt wird die Adhäsion an die basale Membran durch die Bindung des Integrins CD11b/CD18 an noch unbekannte fukosylierte Glycoproteine ermöglicht (Zen et al., 2002). Den Weg der Neutrophilen zwischen den epithelialen Zellen hindurch ermöglicht die CD11b/CD18-vermittelte Bindung an JAM-C, welches in Desmosomen zu finden ist und so die Migration durch Desmosomen erlaubt (Chavakis et al., 2004, Zen et al., 2004, Santoso et al., 2002). Danach folgt die JAML-Bindung an CAR (siehe Abbildung 2). Dieser Schritt ermöglicht die Migration durch Tight Junctions (Zen et al., 2005).

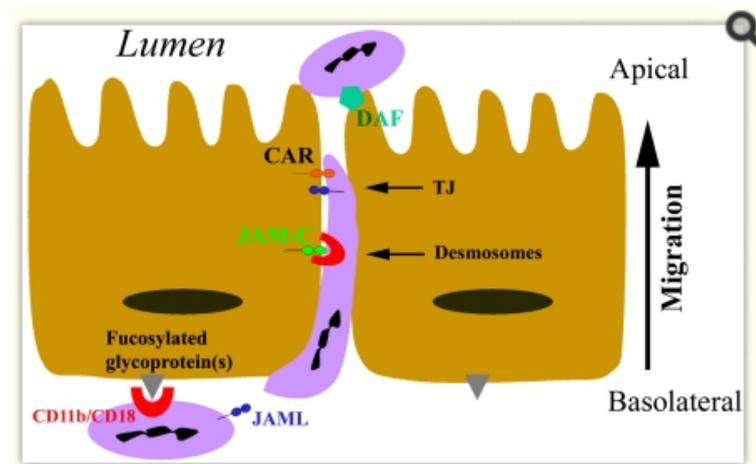


Abbildung 2. Modell der durch JAML-CAR regulierten transepithelialen Migration von PMN im intestinalen Zylinderepithel (Zen et al., 2005)

Neben diesen Zellen exprimieren auch $\gamma\delta$ -T-Zellen, eine Untergruppe der T-Zellen, JAML. Allerdings nur die epidermalen und intestinalen $\gamma\delta$ -T-Zellen, nicht jedoch die aus der Milz stammenden (Witherden et al., 2010). In der Haut von Mäusen finden sich Dendritic epidermal T-cells (DETCs), die in Studien analog zu den humanen $\gamma\delta$ -T-

Zellen in der Epidermis gehandhabt werden (Nestle et al., 2009, Toulon et al., 2009). Die Expression von JAML auf naiven $\gamma\delta$ -T-Zellen ist nur gering, wird aber bei Aktivierung der Zelle verstärkt induziert (Witherden et al., 2010). Sind die $\gamma\delta$ -T-Zellen einmal aktiviert, so fördern sie die Entzündungsreaktion und stimulieren die Reparatur der Hautbarriere, indem sie die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren induzieren (Verdino et al., 2010).

Naive T-Zellen können nicht allein über den T-Zell-Rezeptor aktiviert werden. Zur Aktivierung von naiven T-Zellen ist ein zweites costimulatorisches Signal notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass bei den DETCs die Bindung von JAML an CAR als costimulatorisches Signal den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg auslöst (s. Abbildung 3), der die Sekretion und Synthese von IL-2, TNF- α , dem Keratinozyten-Wachstumsfaktor KGF-1 und INF γ fördert, außerdem trägt er zur Zellproliferation und zur Wundheilung bei (Verdino and Wilson, 2011).

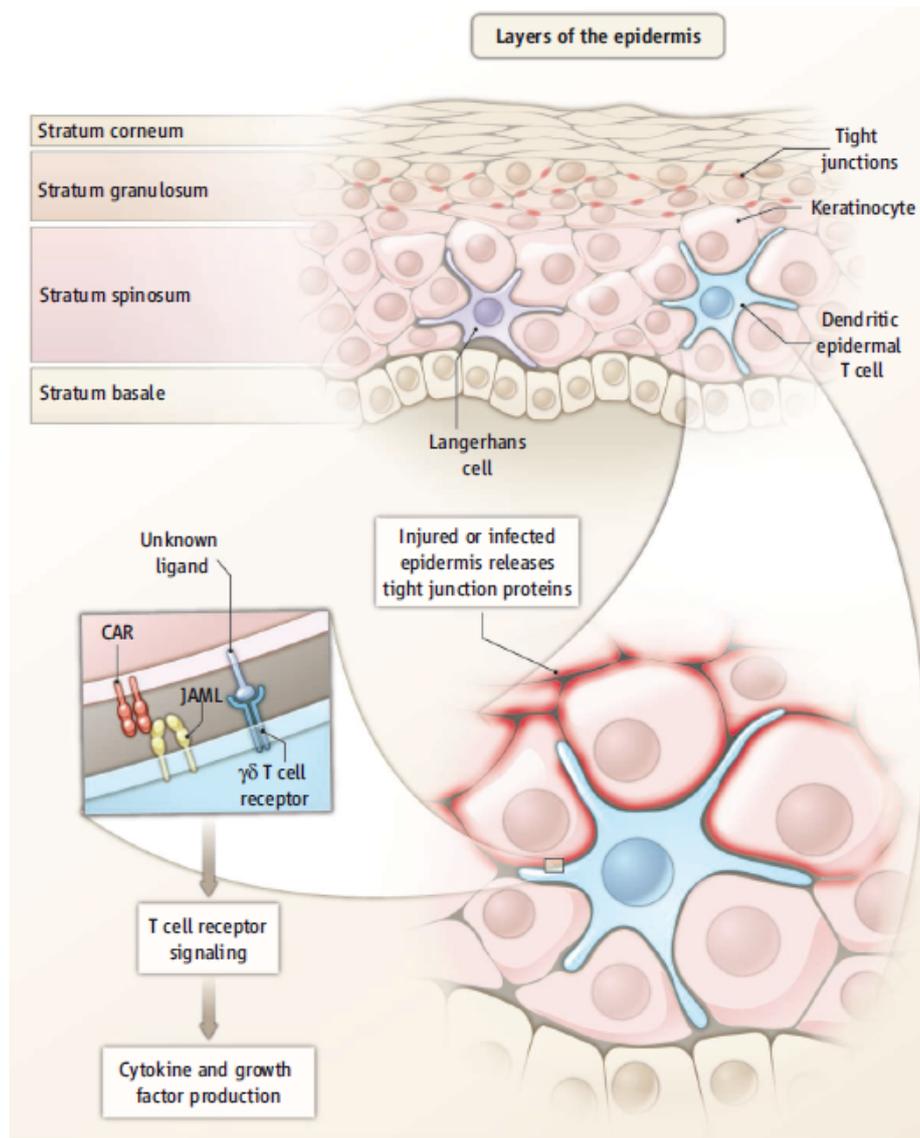


Abbildung 3. Die CAR-JAML-Bindung als costimulatorisches Signal (Shaw and Huang, 2010)

Die klinische Relevanz der CAR-JAML-Interaktion wird beispielsweise durch einen Versuch deutlich, bei dem die Blockierung der JAML-Bindung zu verzögerter Wundheilung bei Mäusen führt (Witherden et al., 2010).

1.3.6 Veränderungen der Tight Junction-Proteine durch Zellen des Immunsystems und durch Zytokine

Wie oben beschrieben bewegen sich Zellen des Immunsystems durch den parazellulären Raum und migrieren so durch Epithelien. Um den Zusammenbruch der epithelialen Barriere zu vermeiden, müssen sich hierzu die Tight Junctions koordiniert öffnen und schließen. Hierbei spielen verschiedene Tight Junction-Proteine, aber vor allem

Occludin und die Familie der JAMs eine Rolle. So führt eine Mutation der N-terminalen zytoplasmatischen Domäne bei Occludin zu einer Heraufregulation der Migration von Neutrophilen durch Epithelzellen (Huber et al., 2000). Kucharzik et al. fanden sowohl in der Mukosa des Kolonepithels von Patienten mit Colitis Ulcerosa als auch bei Morbus Crohn-Patienten eine globale Herabregulation von Occludin und eine vorübergehende Herabregulation von ZO1, Claudin-1 und JAM in unmittelbarer Umgebung der Neutrophilen während ihrer Migration durch das Epithel (Kucharzik et al., 2001).

In der Haut von Psoriasis-Patientin konnte beobachtet werden, dass die in Keratinozyten exprimierte TJ-Proteine Claudin-1, ZO1 und Occludin in der Nähe von Granulozyten herabreguliert sind (Kirschner et al., 2009), wohingegen keine Veränderung in der Nähe von Makrophagen beobachtet wurde. Über T-Lymphozyten ist bislang nichts bekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass in der Nähe CD43-positiver Zellen, die sowohl Neutrophile, T- und B-Lymphozyten als auch Monozyten umfassen, TJ-Proteine herabreguliert werden (Pötzl, 2010).

Auch dendritische Zellen können Tight Junctions öffnen. Im Gastrointestinaltrakt gelangen auf diese Weise Zellfortsätze ins Darmlumen, um direkt Bakterien zu sammeln. Um die Unversehrtheit der epithelialen Barriere zu bewahren, exprimieren die dendritischen Zellen die TJ-Proteine Occludin, Claudin-1 und ZO1 (Rescigno et al., 2001).

In der Haut konnte gezeigt werden, dass die residenten epidermalen dendritischen Zellen, d. h. die Langerhanszellen, die TJ-Proteine Claudin-1, ZO1 und JAM-A exprimieren (Zimmerli et al., 2008, Kirschner et al., 2009, Kubo et al., 2009). Die Aktivierung von Langerhanszellen führt dazu, dass ihre dendritischen Fortsätze sich durch die TJ-Barriere im Stratum granulosum hindurch verlängern. Dabei bilden Langerhanszellen neue Tight Junctions zwischen sich und den benachbarten Keratinozyten. Dies erlaubt der Epidermis das Erkennen von Antigenen und ermöglicht die Aufrechterhaltung der Hautbarriere (Simpson et al., 2011, Kubo et al., 2009, Zimmerli et al., 2008).

Neben den Immunzellen beeinflussen auch Zytokine, die u. a. von Immunzellen gebildet werden, die Lokalisation und Funktion der Tight Junctions. So konnte gezeigt

werden, dass das von Keratinozyten und Makrophagen produzierte Zytokin IL-1 β , welches bei Psoriasis in hohen Konzentrationen zu finden ist (Cooper et al., 1990), zu einer verbreiterten Expression von Occludin und ZO1 führt (Kirschner et al., 2009). Darüber hinaus führt es zu einer biphasischen Veränderung des TERs, d. h. in der frühen Phase der TJ-Bildung wird der TER erhöht, in der späten erniedrigt (Kirschner et al., 2009).

Auch der Tumornekrosefaktor- α , der ebenfalls in erhöhten Konzentrationen in psoriatischer Haut vorhanden ist (Schottelius et al., 2004, Etehadhi et al., 1994) und überwiegend von Makrophagen, aber auch von Lymphozyten, gebildet wird, kann den TER in Keratinozyten biphasisch beeinflussen (Kirschner et al., 2009). Interessanterweise konnte in endothelialen Zellen gezeigt werden, dass TNF- α , ebenso auch INF- γ , zu einer Herabregulation des Cocksackie-and-Adenovirus-Receptors führt (Vincent et al., 2004).

Ebenso konnte für das von Th17-Zellen gebildete IL-17 gezeigt werden, dass es zu einer Herabregulation der TJ-Proteine ZO1, ZO2 und Claudin-7 auf mRNA-Ebene in kultivierten Keratinozyten führt (Gutowska-Owsiak et al., 2012).

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Bei der Psoriasis konnte im Vergleich mit gesunder Haut eine veränderte Expression von am Aufbau der Tight Junctions beteiligten Proteinen nachgewiesen werden (Pummi et al., 2001, Yoshida et al., 2001, Brandner et al., 2006, Peltonen et al., 2007, Watson et al., 2007, Kirschner et al., 2009). So kann eine verbreiterte Expression der Tight Junction-Proteine Occludin und ZO1 und eine Herabregulation von Claudin-1 beobachtet werden (Kirschner et al., 2009).

In einer früheren Arbeit wurde die veränderte Expression der Tight Junction-Proteine sowohl für die Früh- als auch für die Spätform der Psoriasis beschrieben (Kirschner et al., 2009, Pötzl, 2010), allerdings wurde die Ausprägung der Veränderungen noch nicht systematisch zwischen Früh- und Spätform verglichen. Daraus ergibt sich die erste in dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung.

Darüber hinaus konnte in den vorangehenden Arbeiten gezeigt werden, dass Immunzellen Tight Junction-Proteine beeinflussen, so konnte beispielsweise eine Herabregulation von Claudin-1 in unmittelbarer Nachbarschaft zu einwandernden Neutrophilen beobachtet werden (Pötzl, 2010, Kirschner et al., 2009). Bisher wurde aber noch nicht untersucht, welche Interaktionen zwischen T-Lymphozyten, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Psoriasis spielen (siehe Kapitel 1.2), und TJ-Proteinen auftreten. Aus diesem Grund soll nun die Korrelation von CD4-, FoxP3- und CD8- positiven T-Lymphozyten mit den Tight Junction-Proteinen ZO1, Occludin und Claudin-1 untersucht werden.

Zur weiteren Charakterisierung von Tight Junctions und Tight Junction-Molekülen in der Psoriasis sollte des Weiteren das Spektrum der TJ-Proteine erweitert werden. Die Wahl fiel dabei auf den Coxsackie-and-Adenovirus-Receptor, da dieses Molekül zum einen eine wichtige Rolle bei der Migration von Immunzellen durch Epithelien spielt und zum anderen eine wichtige Rolle in der Epidermis postuliert wurde (siehe Kapitel 1.3.4). Die Lokalisation des Coxsackie-and-Adenovirus-Receptors in gesunder und in psoriatischer Haut und die Veränderung seiner Lokalisation in der Umgebung JAML-exprimierender Zellen ist ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Untersuchungsgut

Die in dieser Arbeit verwendeten Hautbiopsien waren im Rahmen von Gewebeentnahmen zur histopathologischen Diagnosesicherung in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums-Hamburg-Eppendorf angefallen. Die in Form von Paraffinblöcken archivierten Hautbiopsien entstammen den Jahren 2004 bis 2006. Zu dieser Arbeit wurden Biopsien von 28 Psoriasis-Patienten im Alter von 17 bis 83 Jahren verwendet, wovon 18 weiblich und 10 männlich waren. Diese Biopsien wurden anhand der in Kapitel 1.1.3 aufgeführten histopathologischen Kriterien in Frühformen und Spätformen unterteilt. Zu den Frühformen zählten 13 Biopsien von 6 männlichen und 7 weiblichen Patienten im Alter von 20 bis 83 Jahren. Zu den Spätformen zählten 15 Biopsien von 5 männlichen Patienten und 10 weiblichen Patienten im Alter von 17 bis 76 Jahren.

Dass nicht Material von jedem hier aufgeführten Patienten in jeder Versuchsanordnung berücksichtigt werden konnte, liegt daran, dass teilweise pro Paraffinblock nur wenig Material zur Verfügung stand, sodass sich nicht genügend geeignete Paraffinschnitte für jeden Versuch gewinnen ließen bzw. die Fixierung einzelner Schnitte auf dem Objektträger nicht gelang, was eine Auswertung bei gefaltetem Schnitt unmöglich machte. Für die Färbung mit den CAR- und JAML-Antikörpern wurden zusätzlich 10 paraffinierte Biopsien von gesunder Haut aus den Jahren 2003 bis 2006 eingesetzt. Das Alter der Spender bei Probenentnahme reichte von 19 bis 89 Jahren. Die Unterscheidung in belichtete oder unbelichtete Haut wurde durch die Lokalisation der Biopsie getroffen. Die Verwendung der Proben wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (PV2366, WF 08/08, 050900). Die Biopsien wurden erst nach Beendigung der Diagnosestellung verwendet.

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	24*60mm, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Eppendorfgefäße	SAFETY CAP, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Feinwaage	Sartorius BP 210 D, Sartorius AG, Göttingen
Feuchtkammer	KreaTech Diagnostics, Amsterdam/ Niederlande
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot II Zeiss, Göttingen; <i>Kamera:</i> CCD-Kamera C4742-95 Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, <i>Software:</i> Openlab 2.0.9. Improvisation, Coventry/ UK
konische Zentrifugenröhrchen	BD Falcon™ conical tubes, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes/ USA
Kühlplatte	medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Magnetrührer	Heidolph MR 3001, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Markierungsstift	Liquid Blocker Super PAP PEN, Daido Sangyo Co. Ltd., Tokyo/ Japan
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, 72 SuperFrost/Plus Objektträger Assistent®
Paraffin-Streckbad	GFL® Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Nr. 1052
pH-Meter	766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Rotationsmikrotom	Leica, Benzheim, RM 2165
Tischzentrifuge	Biofuge 13 H, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortexer	Bender und Hobein AG, Zürich/ Schweiz
Waage	Sartorius BL 3100, Sartorius AG, Göttingen
Wärmeplatte	MTG Medical Technology Vertriebs GmbH, Bruckberg, HT 50
Wärmeschrank	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach

3.1.3 Chemikalien

CaCl ₂ •H ₂ O	Calciumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt
C ₆ H ₈ O ₇ •H ₂ O	Zitronensäure-Monohydrat, Merck KGaA, Darmstadt
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ •2H ₂ O	Trinatriumcitrat-Dihydrat, SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components	Code S3022, DakoCytomation, Glostrup/ Dänemark
DakoCytomation- Proteinblock	(serum free), DakoCytomation, Glostrup/ Dänemark
DakoReal™ Antibody Diluent	Code S2022, DakoCytomation, Glostrup/ Dänemark
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA	Titriplex III; Ethylendiamintetraacetat Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut	Walter CMP GmbH&Co. KG, Kiel
Fluoromount-G™	Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham/ USA
KCl	Kaliumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Natriumchlorid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NDS	Normal Donkey Serum, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove/ USA
NGS	Nomal Goat Serum, Dianova GmbH, Hamburg
Salzsäure 25%	Merck KGaA, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Triton X-100	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma® base	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin	powder substance activity 1360 USP U/mg, Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Polyoxiethylensorbitanmonolaurat, SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen

3.1.4 Puffer und Lösungen

„Blocklösung“ :

1. zum Blocken unspezifischer Bindungen:

970 µl Magermilch 2% bzw. 5%

20 µl NGS (normal goat serum) bzw. 20 µl NDS (normal donkey serum)

2. zur Erniedrigung der Oberflächenspannung und Erhöhung der Zugänglichkeit spezifischer Bindungen:

Zugabe von 10 µl Triton 10%

Citrat-Puffer:

Stammlösung A: 10,50 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$,
gelöst in 500 ml Aqua dest.

Stammlösung B: 14,70 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$
gelöst in 500 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung: 13,50 ml Stammlösung A
61,50 ml Stammlösung B
auf 750 ml mit Aqua dest. auffüllen, pH 6,0 mit 1 M HCl oder
1 M NaOH einstellen

DAPI-Färbebad:

DAPI-Stammlösung: DAPI-Pulver in Aqua dest. gelöst,
Endkonzentration: 5 mg/ml

Gebrauchslösung (1:5000): 40 µl DAPI-Stammlösung in 200 ml PBS gelöst

Magermilch 2% bzw. 5%

0,20 g für 2% bzw. 0,50 g für 5% Magermilch in 10 ml PBS lösen

PBS (phosphate buffered saline) 10x

Stammlösung: 160,00 g NaCl
4,00 g KCl
23,20 g Na₂HPO₄·2H₂O
2,00 g KH₂PO₄
ad 2000 ml Aqua dest., pH 6,9 einstellen

Gebrauchslösung: 1:10

TBST (tris buffered saline) 10x

Stammlösung: 121,10 g Tris-HCL
175,32 g NaCl
wurden zu 1500 ml Aqua dest. hinzugefügt, dann Zugabe von
10,00 ml Tween 20
113,30 ml HCl 25%.

Die Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt mit 1 M und 10 M HCl bzw. 1 M NaOH und auf 2000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Gebrauchslösung: 1:10

TEC-Puffer (Tris-EDTA-Citrat) 20x

Stammlösung: 5,00 g Trizma® base
10,00 g EDTA
6,40 g Tri-Natriumcitrat

wurden zu 950 ml Aqua dest. zugegeben, auf pH 7,8 eingestellt mit 1 M und 10 M HCl bzw. 1 M NaOH und auf 1000 ml mit Aqua dest. Aufgefüllt.

Gebrauchslösung: 1:20

Tris-HCl (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol-hydrochloride):

60,57 g Trizma®base
500 ml Aqua dest.
pH 7,4 mit 1 M HCl oder 1 M NaOH einstellen
ad 1000 ml Aqua dest.

Triton:

Stammlösung (1%): 1,00 g Triton
in 99 ml PBS gelöst

Gebrauchslösung (0,1%): 1:10

Trypsin:

Stammlösung: 1 ml Tris-HCl 0,5mol
9 ml Aqua dest.
0,010 g Trypsin
0,011 g CaCl₂xH₂O

Gebrauchslösung (0,001%): 1 ml Tris-HCl
9 ml Aqua dest.
Daraus 100 µl verwerfen und durch 100 µl
Stammlösung ersetzen

3.1.5 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen

3.1.5.1 Primärantikörper

CD4	Endverdünnung: 1:100	monoklonal, anti-rabbit IgG, Catalog No: 104R, Cell Marque, Rocklin/ USA
CD8 (C-term)	Endverdünnung: 1:500	polyclonal, anti-rabbit IgG, Clone: EP1150Y; Eptomics Inc., Burlingame/ USA
Cldn-1 ms	Endverdünnung: 1:100	polyclonal, anti-mouse IgG ₁ , Clone: 2H10D10, Zymed Laboratories Inc., San Francisco/ USA
Cldn-1 rb	Endverdünnung: 1:300	polyclonal, anti-rabbit Ig, Catalog No: 71-7800, Invitrogen Corporation, Camarillo/ USA
FoxP3	Endverdünnung: 1:50	polyclonal, anti-mouse IgG, Clone: 236A/E7, Acris Antibodies, Hiddenhausen
IL-17	Endverdünnung: siehe Kapitel 4.2	anti-goat IgG, Catalog No: AF2275, R&D Systems Inc., Abingdon/ UK
IL-22	Endverdünnung: siehe Kapitel 4.2	anti-goat IgG, Catalog No: AF782, R&D Systems Inc., Abingdon/ UK
Occludin-goat	Endverdünnung: 1:60	polyclonal, anti-goat, No: sc-8145, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz/ USA
Occludin-ms	Endverdünnung: 1:12	anti-mouse IgG ₁ -κ, Clone: OC-3F10, Zymed Laboratories Inc., San Francisco/ USA
Occludin-rb	Endverdünnung: 1:120	anti-rabbit, Catalog No: 71-1500, Zymed Laboratories Inc., San Francisco/ USA
ZO1 ms	Endverdünnung: 1:50	polyclonal, anti-mouse IgG ₁ , Clone: ZO1-1A12, Zymed Laboratories Inc., San Francisco/ USA
ZO1 rb	Endverdünnung: 1:75	polyclonal, anti-rabbit Ig, Catalog No: 61-7300, Zymed Laboratories Inc., San Francisco/ USA
JAML	Endverdünnung: 1:30	polyclonal, anti-goat IgG, Catalog No: AF 3449, R&D Systems Inc., Abingdon/ UK
CAR	Endverdünnung: 1:75	polyclonal, anti-rabbit, Catalog No: AF3106, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis/ USA

3.1.5.2 Immunglobuline für die Negativkontrollen

Goat IgG	Endverdünnung: entspricht der Konzentration des Primärantikörpers	Normal Goat IgG, Catalog No: AB-108-C, R&D Systems Inc., Abingdon/ UK
Mouse IgG1	Endverdünnung: entspricht der Konzentration des Primärantikörpers	Negative Control Mouse IgG1, Code No: X0931, DakoCytomation, Glostrup/ Dänemark
Rabbit IgG	Endverdünnung: entspricht der Konzentration des Primärantikörpers	Rabbit Control, Code No: X0903, DakoCytomation, Glostrup/ Dänemark

3.1.5.3 Sekundärantikörper

AlexaFluor®488 anti-goat	Endverdünnung: siehe Kapitel 4.2	donkey anti-goat IgG, Catalog No: A11055, Molecular Probes Inc., Eugene/ USA
AlexaFluor®488 anti-ms	Endverdünnung: 1:600	goat anti-mouse IgG, Catalog No: A11029, Molecular Probes Inc., Eugene/ USA
AlexaFluor®488 anti-rb	Endverdünnung: 1:600	goat anti-rabbit IgG, Catalog No: A11034, Molecular Probes Inc., Eugene/ USA
AlexaFluor®594 anti-ms	Endverdünnung: 1:1250	F(ab') ₂ fragment of goat anti-mouse IgG, Catalog No: A11020, Molecular Probes Inc., Eugene/ USA
AlexaFluor®594 anti-rb	Endverdünnung: 1:1250	F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG, Catalog No: A11072, Molecular Probes Inc., Eugene/ USA
Cy TM 3 anti-goat 594	Endverdünnung: für JAML: 1:500 für IL-17/ IL-22: siehe Kapitel 4.2	donkey anti-goat IgG, Code No: 705-165-147, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove/ USA
DyLight TM 594 anti-ms	Endverdünnung: 1:200	donkey-anti-ms IgG, Code No: 200-512-037, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove/ USA
DyLight TM 488 anti-rb	Endverdünnung: 1:200	donkey-anti-rabbit IgG, Code No: 711-485-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove/ USA

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbeprotokolle setzen sich im Wesentlichen aus den drei Teilprozessen Gewebevorbehandlung, Inkubation der Antikörper und der Visualisierung der vorgenannten Schritte zusammen. Standardmäßig wurden für die durchgeführten Färbungen zwei Gewebeschnitte pro Präparat in zwei unabhängigen Färbegängen gefärbt, die nicht Folgeschnitte waren. War die Färbung in Einzelfällen nicht gelungen, so wurde das entsprechende Präparat noch bis zu drei weitere Male gefärbt. Um die bei manchen Präparaten nur gering vorhandenen Gewebeschnitte nicht unnötig zu verbrauchen wurde in Einzelfällen bei sehr gut auswertbarer Färbung nur ein Gewebeschnitt pro Präparat gefärbt.

3.2.1.1 Vorbereiten der Gewebeschnitte

Aus den Paraffinblöcken wurden am Mikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Um eine bessere Schneidbarkeit des Paraffins zu erreichen, wurden die Blöcke vor ihrer Bearbeitung auf eine auf -9° C gekühlte Platte gelegt. Die Paraffinschnitte wurden nach dem Schneiden am Mikrotom zum Glätten zuerst in raumtemperaturwarmem Leitungswasser aufgefangen und direkt anschließend in 42° C warmes vollentsalztes Wasser im Paraffin-Streckbad gestreckt. Nachdem die Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen worden waren, wurden sie auf einer Wärmeplatte bei 44° C so lange getrocknet, bis mit bloßem Auge kein Wasser mehr zu sehen war und anschließend über Nacht im Wärmeschrank bei 52° C weiter getrocknet. Die Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Entparaffinierung verblieben die Schnitte zweimal für je 20 Minuten in Xylol. Anschließend wurde das Gewebe in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und zwar zuerst unter Schwenken in Ethanol absolut, danach 5 Minuten in einer weiteren Küvette in Ethanol absolut. Im Anschluss wurde das Gewebe zuerst in 96%, anschließend in 80% und schließlich in 70% Ethanol geschwenkt, um danach für fünf Minuten in Aqua dest. zu verbleiben. Dies wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zum hitzeinduzierten Epitop-Retrieval wurden die Präparate für zwei Mal 10 Minuten in TEC-Puffer bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Danach wurden die Schnitte in lauwarmem TEC-Puffer 20 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt, was zur Renaturierung des Gewebes führt. Die hitzeinduzierte Antigendemaskierung ist

notwendig, um Antigene darzustellen, die durch Proteinquervernetzung maskiert (Noll and Schaub-Kuhnen, 2000) und somit für die immunhistologische Untersuchung unzugänglich sind. Diese durch die Formalinfixierung verursachten Proteinmodifikationen können durch Erhitzen der Gewebeschnitte wieder remodifiziert werden (Lang, 2006), sodass die Anzahl immunreaktiver Epitope erhöht wird. Vor dem proteolytisch induzierten Epitop-Retrieval, welches ebenfalls der Demaskierung der Antigene und der Steigerung der Permeabilität des Gewebes dient (Lang, 2006), wurden die Schnitte zwei Mal drei Minuten in TBST-Puffer gewaschen und anschließend mit dem proteolytischen Enzym Trypsin behandelt. Dazu wurde das Gewebe in 0,001% Trypsin bei 37° C in der Feuchtkammer für 15 Minuten inkubiert und anschließend zuerst in Aqua dest. und dann zwei Mal drei Minuten mit TBST-Puffer gespült.

Nach Abklopfen der Pufferlösung vom Objektträger wurden die Gewebeschnitte mit einem Markierungsstift umrandet, um eine geringe Fläche zur gezielten Auftragung der nachfolgenden Reagenzien zu erhalten. Anschließend wurden die Präparate vor der Inkubation mit dem Antikörper mit einer Blocklösung versetzt, um unspezifische Reaktionen des Primärantikörpers im Gewebe zu verhindern. Zum Blocken wurde der Proteinblock DakoCytomation (serum free) der Firma Dako, Glostrup/ Dänemark verwendet, der Casein, ein hydrophiles Protein, enthält, das die Anzahl unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers und sekundärer Reagenzien senkt, bzw. zum Etablierungsversuch der IL-17- und IL-22-Antikörper die unter Kapitel 3.1.4 angegebene „Blocklösung“. In einer Feuchtkammer wurde dieser für die Dauer von 30 Minuten auf dem Gewebe belassen.

3.2.1.2 Immunhistochemische Doppelfärbung

Bei der nachfolgend angewandten immunhistochemischen Doppelfärbung erfolgt die Detektion zweier unterschiedlicher Epitope auf demselben Präparat. Für diese Technik sind zwei Primärantikörper unterschiedlicher Tierspezies nötig. Zur vorliegenden Arbeit wurden die Tight Junction-Proteine ZO1, Cldn-1, Occludin und CAR mit verschiedenen immenzellen-markierenden Proteinen entsprechend folgender Kombinationen verknüpft.

Tight Junction-Protein	Immunzellen-markierendes Protein
ZO1	CD4 FoxP3 CD8
Claudin-1	CD4 FoxP3
Occludin	CD4 FoxP3
CAR	JAML

Die Färbung erfolgte mit einem Gemisch aus den Primär- bzw. den Sekundärantikörpern, die entsprechend u. a. Tabelle in PBS bzw. in DakoReal™ Antibody Diluent S2022 oder Dako Antibody Diluent S3022 gelöst wurden. Die Kombination der entsprechenden Antikörper in ihrer jeweils geeigneten Verdünnung kann ebenfalls dieser Tabelle entnommen werden. Die Inkubation der Gewebe mit dem entsprechenden Primärantikörpergemisch erfolgte bei 4°C über Nacht in der Feuchtkammer. Zudem wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper mitgeführt. Diese Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers mit dem spezifischen Immunglobulin derselben Spezies in gleicher Konzentration wie der Primärantikörper inkubiert und danach wie die übrigen Präparate des Färbvorgangs weiterbehandelt. Am nächsten Tag wurden die Präparate drei Mal drei Minuten in TBST gewaschen. Nach Abklopfen des TBST-Puffers von den Objektträgern wurde das entsprechende Sekundärantikörpergemisch aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer auf den Gewebeschnitten belassen. Nach anschließendem Spülen der Schnitte für 5 Minuten in PBS erfolgte die Kerngegenfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Diamino-Phenylindol, Verdünnung 1:5000 in PBS) für die Dauer von einer Minute. DAPI lagert sich insbesondere an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an und eignet sich dadurch zur Markierung von DNA und somit zur Darstellung von Zellkernen (Tanious et al., 1992, Wilson et al., 1990). Danach wurden die Schnitte drei Mal fünfzehn Minuten in PBS gewaschen, durch seitliches Abklopfen getrocknet und abschließend mit Fluoromount G™ eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei 4° C.

Übersicht der Kombinationen der in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörpermischungen und ihre jeweilige Endkonzentration:

Primär-AK 1	Primär-AK 2	Sekundär-AK 1	Sekundär-AK 2
Cldn-1 ms, 1:100, gelöst in DakoReal™ AD S2022	CD4, 1:100, gelöst in DakoReal™ AD	AlexaFluor®594 anti-ms, 1:1250, gelöst in Dako AD S3022	AlexaFluor®488 anti-rb, 1:600, gelöst in Dako AD S3022
Cldn-1 rb, 1:300, gelöst in PBS	FoxP3, 1:50, gelöst in PBS	AlexaFluor®594 anti-rb, 1:1250, gelöst in PBS	AlexaFluor®488 anti-ms, 1:600, gelöst in PBS
Occl goat, 1:60, gelöst in PBS	FoxP3, 1:50, gelöst in PBS	Cy™3 anti-goat 594 1:300, gelöst in PBS	DyLight™488 anti- rb, 1:400, gelöst in PBS
Occl ms, 1:12, gelöst in PBS	CD4, 1:100, gelöst in PBS	AlexaFluor®488 anti-ms, 1:600, gelöst in PBS	AlexaFluor®594 anti-rb, 1:1250, gelöst in PBS
Occl rb, 1:120, gelöst in PBS	FoxP3, 1:50, gelöst in PBS	AlexaFluor®594 anti-rb, 1:1250, gelöst in PBS	AlexaFluor®488 anti-ms, 1:600, gelöst in PBS
ZO1 ms, 1:50, gelöst in PBS	CD4, 1:100, gelöst in PBS	AlexaFluor®594 anti-ms, 1:1250, gelöst in PBS	AlexaFluor®488 anti-rb, 1:600, gelöst in PBS
ZO1 ms, 1:50, gelöst in PBS	CD8, 1:500, gelöst in PBS	DyLight anti-mouse 594, 1:200, gelöst in PBS	DyLight anti-rabbit 488, 1:200, gelöst in PBS
ZO1 rb, 1:150, gelöst in PBS	FoxP3, 1:50, gelöst in PBS	AlexaFluor®594 anti-rb, 1:1250, gelöst in PBS	AlexaFluor®488 anti-ms, 1:600, gelöst in PBS

3.2.1.3 Immunhistochemische Einzelfärbung auf Folgeschnitten

Zur Färbung auf Folgeschnitten wurden Folgeschnitte von je 5 µm Dicke verwendet. Die Einzelfärbung auf Folgeschnitten wurde angewandt, da bei der Doppelfärbung mit CAR- und JAML-Antikörper die JAML-Färbung nicht zu sehen war. Der Ablauf der Färbung unterscheidet sich nicht von der Doppelfärbung, lediglich wird pro Gewebeschnitt nur ein Antikörper verwendet.

Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und ihre jeweilige Endkonzentration auf Folgeschnitten:

Antikörper des ersten Gewebeschnittes:		Antikörper des Folgeschnittes:	
Primär-AK	Sekundär-AK	Primär-AK	Sekundär-AK
CAR rb, 1:75, gelöst in PBS	DyLight™488 anti-rb, 1:200, gelöst in PBS	JAML goat, 1:30, gelöst in DakoReal™ AD S2022	Cy™3 anti-goat 594 1:500, gelöst in Dako AD S3022

3.2.2 Visualisierung

Die Visualisierung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiophot II der Firma Zeiss. Die Bilder wurden mit der CCD-Kamera der Firma Hamamatsu aufgenommen und mit Hilfe der Software Openlab 2.0.9. Improvion bearbeitet.

3.2.3 Bildbearbeitung

Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Adobe® Photoshop CS4.

3.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten Zweistichproben-t-test (student's t-test). Statistische Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert. Die Berechnung wurde mit einem Programm der Firma GraphPad, Inc. durchgeführt (GraphPad Software, 2005).

3.2.5 Bestimmung der Eindringtiefe von Immunzellen

Bei den mikroskopierten Hautschichten wurde sowohl die Dermis als auch die Epidermis erfasst. Die Einteilung der Epidermis erfolgte in 4 Schichten. Das Stratum basale bildet dabei die einreihige zur Dermis gelegene Zellschicht. Das Eindringen einer Zelle galt hierbei als positiv, sobald die Immunzelle sich zu ihrem überwiegenden

Anteil zwischen diese Basalzellen geschoben hatte. Ebenfalls morphologisch eindeutig abzugrenzen war das Stratum corneum. Die dazwischen gelegenen Hautschichten, das Stratum spinosum und das Stratum granulosum wurden morphologisch durch die Form der Zellen unterschieden. Das Stratum spinosum zeigt voluminösere Keratinozyten während im Stratum granulosum die Keratinozyten abgeflacht sind. Darüber hinaus enthalten sie Granula. Die weitere Unterteilung des Stratum spinosums in oberes und unteres Stratum spinosum erfolgte in der Mitte der Hautschicht. Unter der Eindringtiefe wird im Folgenden die am weitesten nach außen gelegene Hautschicht verstanden, in der gefärbte Zellen zu finden sind. Die Eindringtiefe der Zellen in die einzelnen Hautschichten war immer dann erreicht, wenn die Zelle zu ihrem überwiegenden Anteil, also zu mehr als der Hälfte, in die höhergelegene Schicht eingedrungen war. Hierbei genügte das Vorfinden schon einer Zelle in der entsprechenden Epidermisschicht.

3.2.6 Auszählung der CD4- und FoxP3-positiven Zellen

Die Auszählung CD4-positiver und FoxP3-positiver Zellen diente der Ermittlung eines Zusammenhanges zwischen der Menge der Zellen und dem Expressionsmuster der Tight Junction-Proteine. Dazu wurden zum einen die in der Epidermis vorkommenden FoxP3-positiven und die in der Epidermis vorkommenden CD4-positiven Zellen in drei jeweils beliebigen Feldern von einer Größe von jeweils ca 0,18 mm² in einem Paraffinschnitt von 5 µm Dicke ausgezählt. Die Anzahl der pro Feld gefundenen Zellen wurde addiert.

Darüber hinaus wurde der Quotient der Gesamtzahl von FoxP3- und CD4-positiven Zellen eines Schnittes einer Biopsie gebildet. Dabei handelte es sich allerdings weder um denselben Schnitt noch um Folgeschnitte.

3.2.7 Menge der JAML-positiven Zellen

Die Menge der JAML-positiven Zellen pro Bildausschnitt wurde mit „sehr viele“ oder „vereinzelt“ angegeben. Dabei bedeutet „sehr viele“, dass über 50 JAML-positiv Zellen in einem Übersichtsbild von 0,18 mm² gefunden wurden, „vereinzelt“, dass weniger als 10 JAML-positiv Zellen gefunden wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Interaktion von ZO1 mit CD4-, FoxP3- und CD8-positiven Zellen

Für die ZO1-Färbung konnten 12 Früh- und 11 Spätformen ausgewertet werden. Von diesen zeigten 6 (26,0%) Gewebeprobe eine verglichen mit normaler Haut nur geringfügig verbreiterte Expression von ZO1 (davon 3 Früh- und 3 Spätformen), die das obere Stratum spinosum umfasst, und 17 Gewebeprobe (74,0%) eine stark verbreiterte ZO1-Expression bis ins untere Stratum spinosum oder bis ins Stratum basale (davon 9 Früh- und 8 Spätformen). Dies entspricht bei gering verbreiteter Expression 25% der Frühformen und 27,3% der Spätformen sowie bei stark verbreiteter Expression 75% der Frühformen und 72,7% der Spätformen. Wird für die gering verbreiterte Expression der Zahlenwert 1, für die stark verbreiterte Expression der Zahlenwert 2 gesetzt, so unterscheiden sich Früh- und Spätformen in der Ausprägung der Expression von ZO1 nicht ($p=0,9068$).

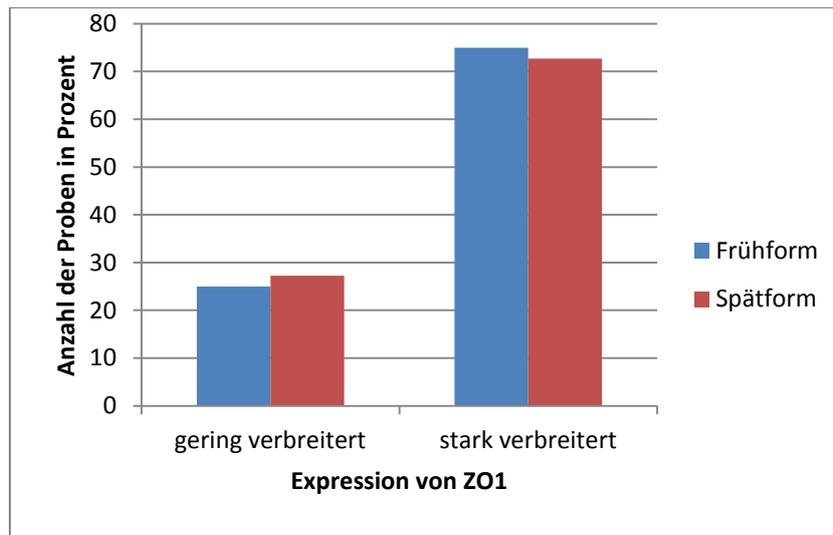


Abbildung 4. Zusammenhang zwischen Expression von ZO1 und Stadium der Erkrankung

ZO1 gering verbreitert: Stratum granulosum und oberes Stratum spinosum, ZO1 stark verbreitert: Stratum granulosum und gesamtes Stratum spinosum, teilweise sogar Stratum basale

4.1.1 Interaktion von ZO1 mit CD4-positiven Zellen

Die Doppelfärbung mit dem ZO1-Antikörper und anti-CD4 erfolgte mit 12 Früh- und 11 Spätformen der Psoriasis vulgaris.

Eine detailliertere Analyse zeigt, dass es eine positive Korrelation zwischen dem ZO1-Expressionsmuster (geringfügig verbreitert versus stark verbreitert) und der

Eindringtiefe der CD4-positiven Zellen in die Haut gibt ($p=0,0007$). Zur Auswertung wurden alle 23 Gewebeproben herangezogen. Interessanterweise finden sich bei normalem oder geringfügig verbreitertem ZO1-Expressionsmuster keine CD4-positiven Zellen in den äußeren Schichten der Epidermis (Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum). In diesen Proben zeigen sich CD4-positive Zellen lediglich in der Dermis und bei weiteren 3 (50%) in Dermis und Stratum basale. Dagegen sind in allen 17 (100%) Geweben mit starker ZO1-Hochregulation CD4-positive Zellen in der Epidermis zu finden. Dabei finden sich CD4-positive Zellen in Dermis und Stratum basale bei 6 (35,3%) dieser Schnitte, bei weiteren 6 (35,3%) finden sich Zellen in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum und bei 5 (29,4%) reichen die Zellen bis ins Stratum granulosum (s. Abbildung 5). Folglich zeigt sich, dass, sollten sich Zellen im Stratum spinosum und/ oder Stratum granulosum finden, es sich nicht um Gewebe mit gering verbreitertem ZO1 handelt. Finden sich Zellen im Stratum basale, kann die Probe sowohl ein gering als auch ein stark verbreitertes ZO1-Expressionsmuster aufweisen. Ergänzend hierzu kann korreliert werden, dass die Gewebeproben, bei denen sich CD4-positive Zellen nur in der Dermis nicht aber in der Epidermis finden, generell über ein nur gering verbreitertes Expressionsmuster verfügen.

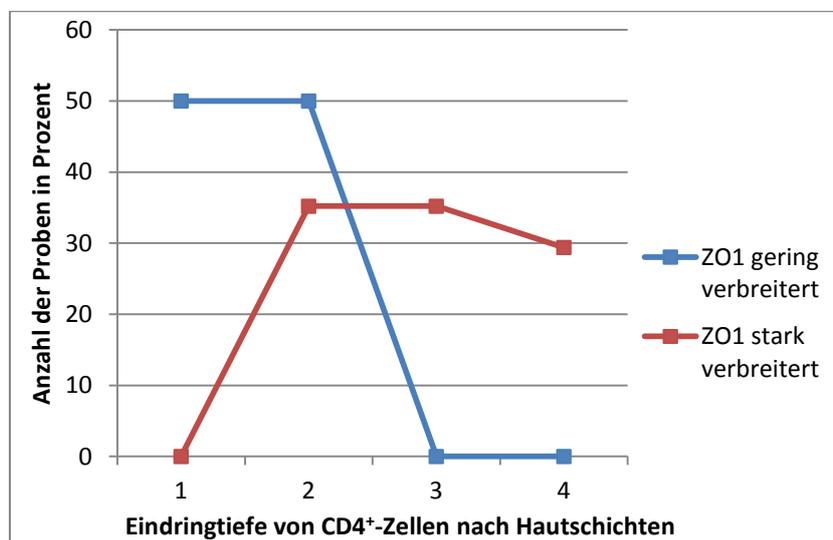


Abbildung 5. Zusammenhang zwischen Eindringtiefe von CD4-positiven Zellen in die Haut und ZO1-Expressionsmuster

1: Infiltration von Zellen nur in der Dermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration in Dermis, Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum. ZO1 gering verbreitert: Stratum granulosum und oberes Stratum spinosum, ZO1 stark verbreitert: Stratum granulosum und gesamtes Stratum spinosum, teilweise sogar Stratum basale

Hingegen zeigt sich in Bezug auf die Eindringtiefe kein Unterschied zwischen Früh- und Spätform ($p=0,7529$). Das Fehlen von CD4-positiven Zellen in der Epidermis war bei einer (8,3%) Früh- und 2 (18,2%) Spätformen der Fall. Zellen in der Epidermis im Stratum basale fanden sich bei 5 (41,6%) Früh- und 3 (27,2%) Spätformen, bis ins Stratum spinosum bei 3 (25%) Früh- und 3 (27,2%) Spätformen und bis ins Stratum granulosum bei 2 (16,6%) Früh- und 3 (27,2%) Spätformen (s. Abbildung 6).

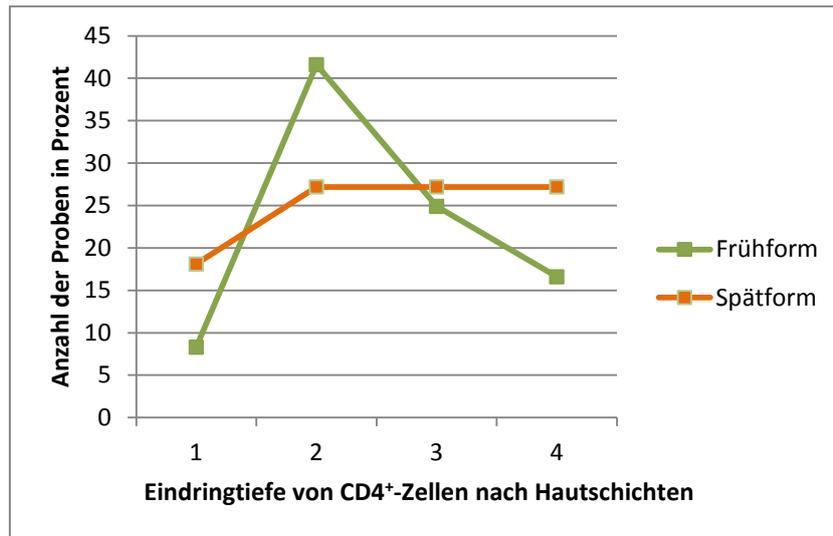


Abbildung 6. Zusammenhang zwischen Eindringtiefe von CD4-positiven Zellen in die Haut und Stadium der Psoriasis

1: Infiltration von Zellen nur in der Dermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration bis ins Stratum granulosum

Von den insgesamt 23 untersuchten Gewebeproben kam es zur räumlichen Nähe von ZO1 mit CD4-positiven Zellen in sechs Früh- und sechs Spätformen. Dabei wurde in direkter Umgebung der CD4-positiven Zellen sowohl eine Unterbrechung des ZO1-Expressions-musters als auch keine Unterbrechung beobachtet. Von den 21 ausgewerteten CD4-positiven Zellen mit Kontakt zu ZO1-positiven Zellen zeigen 14 (66,6%) eine Unterbrechung von ZO1 und 7 (33,3%) keine Unterbrechung. Dies war jedoch unabhängig von der Tatsache, ob es sich um eine Früh- oder Spätform handelte. Bei den Frühformen zeigten 5 Zellen (62,5%) in ihrer Umgebung eine Unterbrechung von ZO1 und 3 (37,5%) keine Veränderung, bei den Spätformen zeigten 9 (69,2%) eine Unterbrechung und 4 (30,8%) keine Veränderung. Auch wenn nicht jede CD4-positive Zelle zur Herabregulation von ZO1 führt, so ergibt doch die Infiltration einer größeren Menge von CD4-positiven Zellen in die Epidermis das Bild einer Zerstückelung von

ZO1. In den CD4-positiven Zellen wurde keine Koexpression mit ZO1 gesehen (s. Abbildung 7).

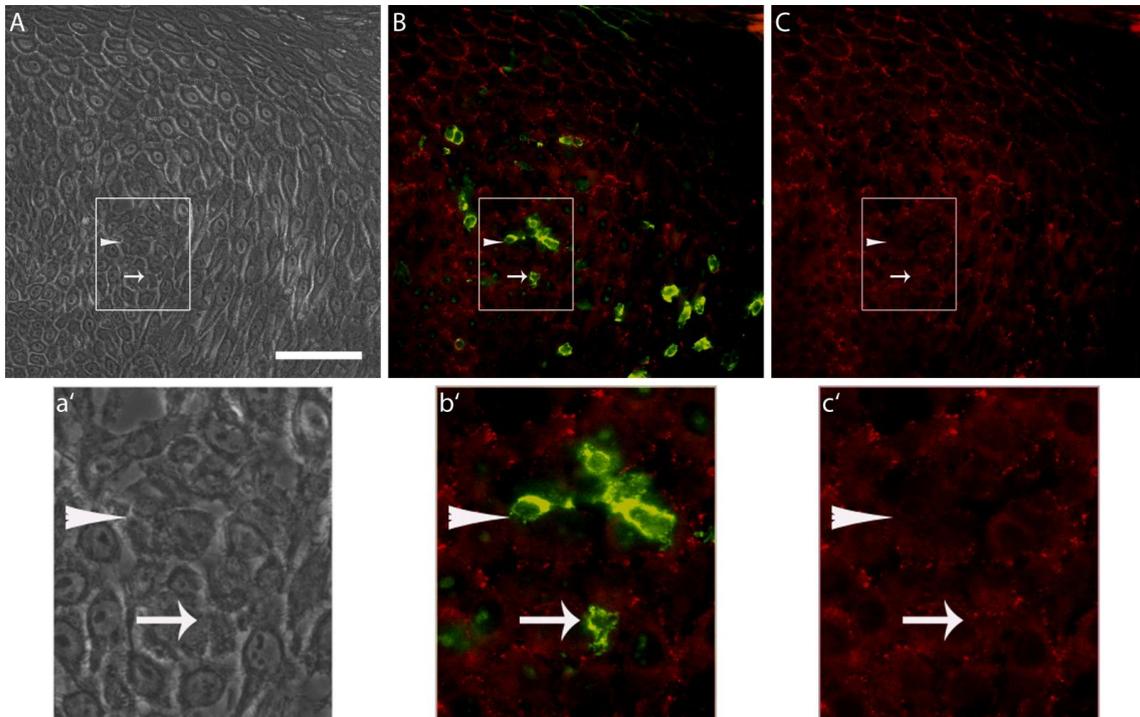


Abbildung 7. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 und CD4 in einer Spätform der Psoriasis
 Aus fototechnischen Gründen musste eine hohe Belichtungszeit gewählt werden. Die gelbliche Färbung ist der Überbelichtung geschuldet und weißt nicht auf eine Koexpression hin.
A: Phasenkontrastbild, **a`:** vergrößerter Ausschnitt aus A, **B:** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 (rot) und CD4 (grün), **b`:** vergrößerter Ausschnitt aus B, **C:** Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 (rot) **c`:** vergrößerter Ausschnitt aus C, die **Pfeilspitze** zeigt auf mehrere CD4-positive Zellen, in deren unmittelbarer Umgebung eine Unterbrechung des ZO1-Expressionsmusters zu finden ist, der **Pfeil** zeigt auf eine CD4-positive Zelle, in deren Umgebung es nicht zu einer Unterbrechung der ZO1-Expression kommt; Längenmaßstab 50 µm

4.1.2 Interaktion von ZO1 mit FoxP3-positiven Zellen

Um zu überprüfen, ob sich speziell um den Subtyp der regulatorischen, also FoxP3-positiven Zellen, eine Herabregulation des Tight Junction-Proteins ZO1 findet, wurde die Doppelfärbung des ZO1-Antikörpers mit dem Antikörper gegen FoxP3 durchgeführt. In diese Doppelfärbung waren 16 Gewebeproben mit einbezogen.

Es zeigte sich, wie bei den CD4-positiven Zellen, ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Eindringtiefe der FoxP3-positiven Zellen in die Epidermis und der verbreiterten Expression von ZO1 ($p=0,0016$), wobei eine stark verbreiterte Expression von ZO1 gleichzusetzen ist mit einer tieferen Eindringtiefe in höher gelegene epidermale Schichten. So finden sich in den 9 Gewebeproben mit hoher Expression niemals FoxP3-positive Zellen nur in Dermis und Stratum basale.

Stattdessen zeigte sich, dass bei stark verbreiterem ZO1 die FoxP3-positiven Zellen immer bis mindestens ins Stratum spinosum bzw. sogar bis ins Stratum granulosum vorgedrungen waren. Das gegenteilige Bild zeigte sich bei Gewebeproben mit weitgehend normaler ZO1-Expression. Während hier 3 Proben (42,8%) FoxP3-positive Zellen nur in der Dermis und 2 (28,6%) in Dermis und Stratum basale aufwiesen, wurde jeweils nur in einer Probe (14,3%) Zellen bis zum Stratum spinosum bzw. Stratum granulosum gefunden. Eine Eindringtiefe ins Stratum corneum wird in keiner der Proben erreicht. (siehe Abbildung 8)

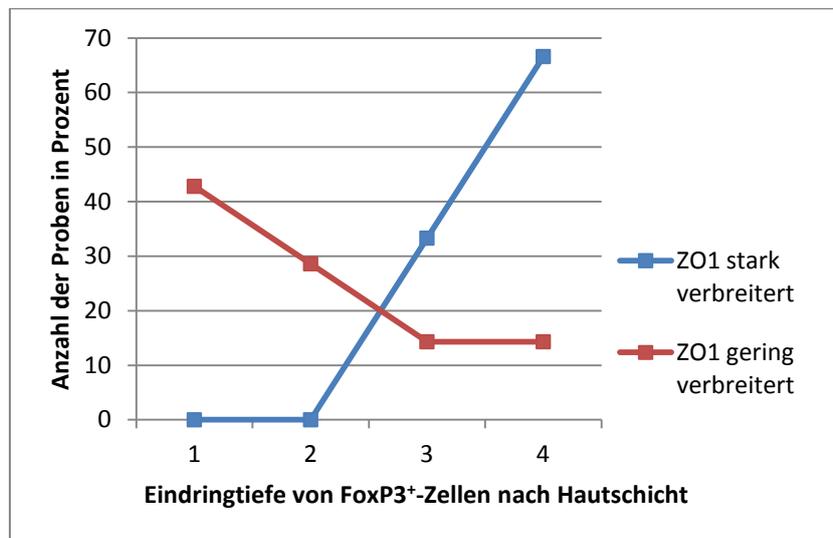


Abbildung 8. Zusammenhang zwischen ZO1-Expressionsmuster und Eindringtiefe FoxP3-positiver Zellen in die Haut

1: Infiltration von Zellen nur in der Dermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration in Dermis, Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum. ZO1 gering verbreitert: Stratum granulosum und oberes Stratum spinosum, ZO1 stark verbreitert: Stratum granulosum und gesamtes Stratum spinosum, teilweise sogar Stratum basale

Interessanterweise war bei allen 9 Gewebeschnitten mit verbreiteter ZO1-Expression auch eine große Menge an FoxP3-positiven Zellen in der Epidermis zu finden, wohingegen alle 9 Schnitte mit geringfügig verbreiterem Expressionsmuster eine deutlich niedrigere Zellzahl an FoxP3-positiven Zellen in der Epidermis aufwiesen. (s. Abbildung 9). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0,0002$).



Abbildung 9. Zusammenhang zwischen ZO1-Expressionsmuster und Menge an FoxP3-positiven Zellen
 ZO1 gering verbreitert: Stratum granulosum und oberes Stratum spinosum, ZO1 stark verbreitert: Stratum granulosum und gesamtes Stratum spinosum, teilweise sogar Stratum basale

Ein Zusammenhang zwischen Eindringtiefe und Stadium der Psoriasis kann zwar tendenziell beobachtet werden, erreicht aber keine statistische Signifikanz ($p=0,3504$). So macht es den Anschein, dass bei den Spätformen häufiger Zellen in höheren epidermalen Schichten zu finden sind. In den untersuchten Spätformen waren in 5 (62,5%) der 8 untersuchten Spätformen die FoxP3-positiven Zellen in allen Schichten bis ins Stratum granulosum zu finden, während von den 8 untersuchten Frühformen nur 3 Fälle (37,5%) Zellen bis ins Stratum granulosum aufwiesen (s. Abbildung 10).

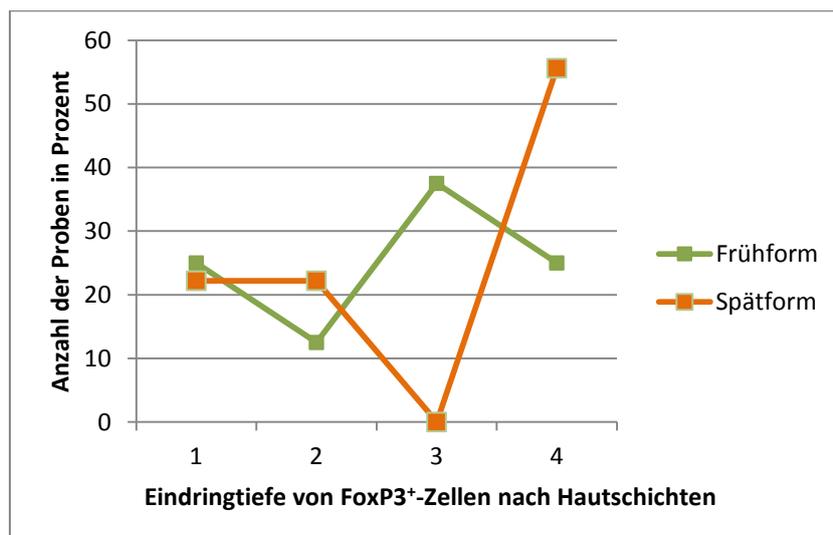


Abbildung 10. Zusammenhang zwischen Stadium der Erkrankung und Eindringtiefe FoxP3-positiver Zellen in die Haut

1: Infiltration von FoxP3-positiven Zellen nur in der Dermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration bis ins Stratum granulosum

Zur direkten räumlichen Nähe von ZO1 und FoxP3 kam es in 28% (2 von 7) der Frühformen und in 75% (6 von 8) der Spätformen. Trotz fehlender statistischer Signifikanz ($p=0,0813$) lässt sich erkennen, dass es erheblich häufiger in den Spätformen zu einem Kontakt zwischen FoxP3 und ZO1 kommt als in den Frühformen. Der direkte Kontakt zwischen ZO1 und FoxP3 zeigte in allen 8 beobachteten Fällen eine örtliche, direkt um die Zelle gelegene Herabregulation/ Unterbrechung von ZO1 (siehe Abbildung 11).

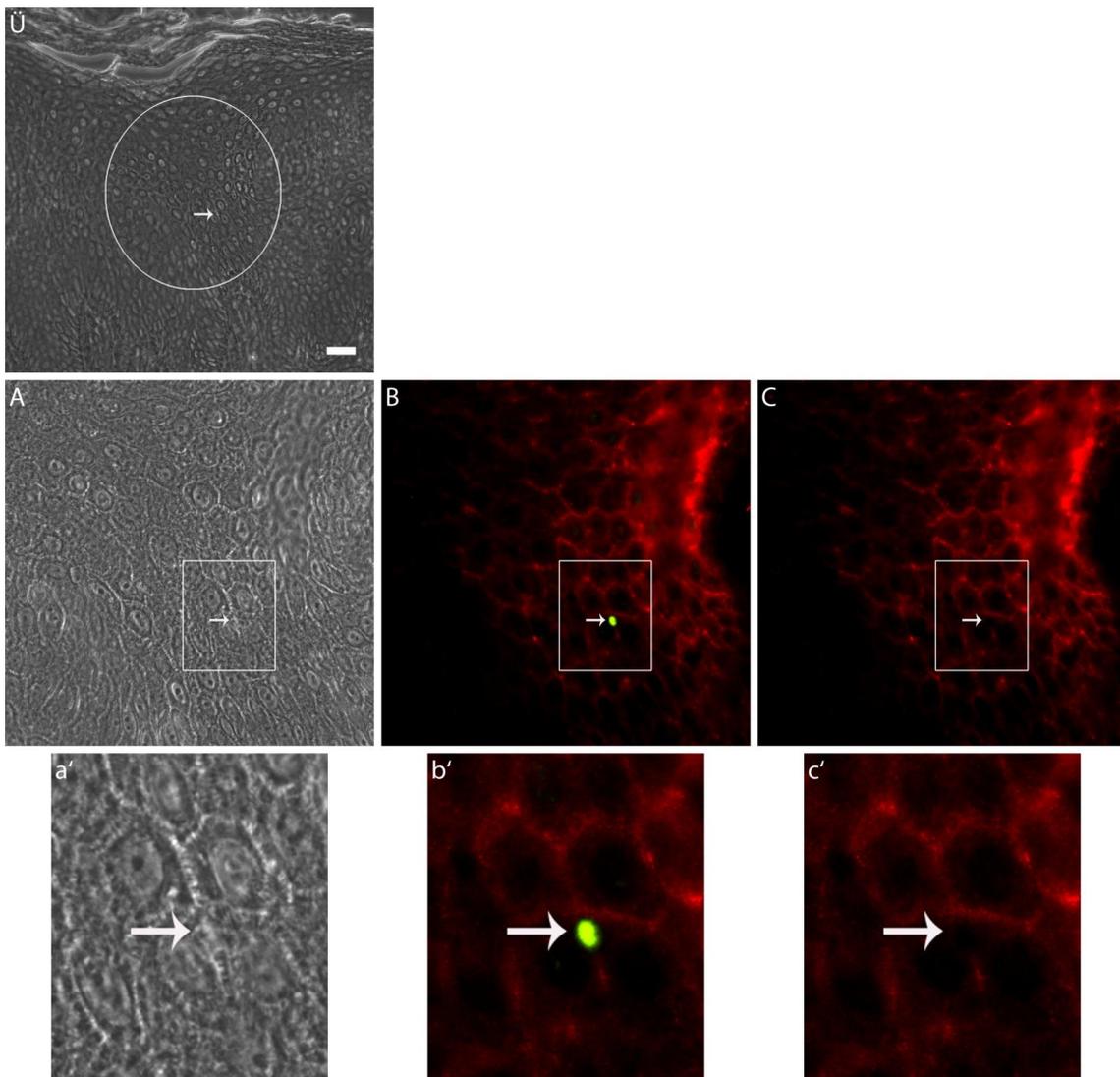


Abbildung 11. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 und FoxP3 in einer Spätform der Psoriasis
 Ü: Übersichtsbild: die Ellipse markiert den Bereich, aus dem Bild A entnommen ist, A: Phasenkontrastbild, a` : vergrößerter Ausschnitt aus A, B: Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen von ZO1 (rot) und FoxP3 (grün), b` : vergrößerter Ausschnitt aus B, C: Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 (rot), c` : vergrößerter Ausschnitt aus C mit deutlicher Unterbrechung des ZO1-Expressionsmusters, der Pfeil zeigt in A, a`, B und b` auf eine FoxP3-positive Zelle, in C und c` ist an dieser Stelle eine deutliche Unterbrechung des ZO1-Expressionsmusters zu erkennen; Längenmaßstab: 50 µm

Somit gehören die FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen zu den ZO1 herabregulierenden CD4-Zellen. Um der Frage nachzugehen, ob auch weitere Subtypen der CD4-Zellen an der Herabregulation von ZO1 beteiligt sein könnten, wurde der Quotient aus der Anzahl der Zellen, die zu einer Herabregulation von ZO1 führen, und der Gesamtanzahl der CD4-Zellen, die im Kontakt mit ZO1 näher betrachtet wurden (siehe Kapitel 4.1.1) mit dem Quotienten aus der Anzahl der FoxP3-positiven Zellen und der Anzahl der CD4-positiven Zellen verglichen. Der Quotient aus der Anzahl herabregulierter Zellen und der Anzahl der gesamten CD4-Zellen mit ZO1-Kontakt ergibt 0,67 (14 Herabregulationen bei 21 Kontakten zwischen ZO1- und CD4-positiven Zellen). Der Mittelwert aus den Quotienten der Anzahl FoxP3-positiver und CD4-positiver Zellen ergibt 0,33, bei einer Standardabweichung von 0,22 (n=12 Proben). Diese Differenz lässt vermuten, dass mehr Zellen ZO1 herabregulieren als wir FoxP3-Zellen erwarten, was zeigt, dass wahrscheinlich noch weitere CD4-Subtypen an der Herabregulation von ZO1 beteiligt sind (s. Abbildung 12).

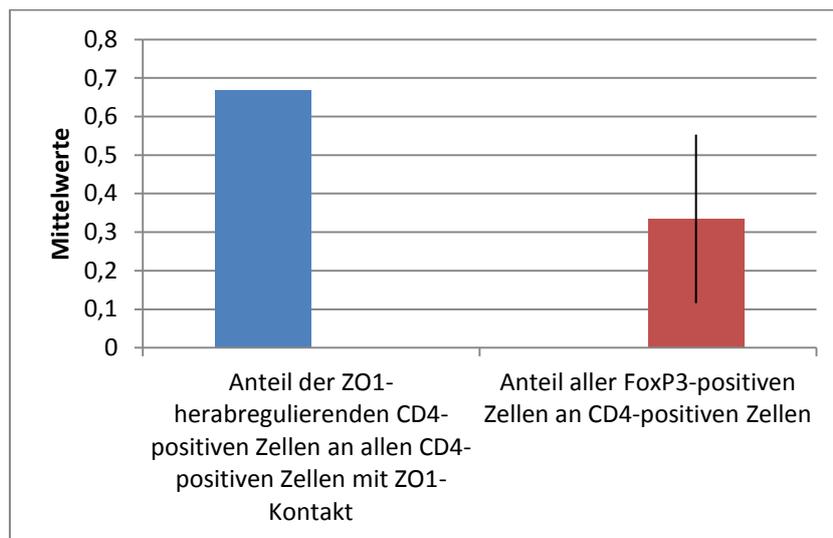


Abbildung 12. Herabregulierende CD4-positive Zellen versus FoxP3-positive Zellen

Hinsichtlich des Verhältnisses aus der Gesamtheit der in der Epidermis gefundenen FoxP3-positiven Zellen und der Gesamtheit aller in der Epidermis gefundenen CD4-positiven Zellen bezüglich der Unterteilung in Früh- und Spätformen gibt es keinen Unterschied. Von den 12 ausgezählten Gewebeproben gehören 7 zu den Spät- und 5 zu den Frühformen. Bei den Frühformen lag der Mittelwert der Quotienten aus FoxP3-positiven und CD4-positiven Zellen bei 0,30 mit einer Standardabweichung von 0,16,

bei den Spätformen lag der Mittelwert bei 0,36 und die Standardabweichung bei 0,26. Dieser geringe Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p=0,6525$). Ebenso zeigt sich kein Unterschied im FoxP3-CD4-Quotienten bei unterschiedlicher ZO1-Expression ($p=0,5583$). Bei 5 Gewebeproben mit stark verbreiteter ZO1-Expression lag der Mittelwert des Quotienten bei 0,26 (Standardabweichung: 0,33), bei 4 Gewebeproben mit gering verbreiteter ZO1-Expression lag der Mittelwert der Quotienten bei 0,37 (Standardabweichung: 0,17).

4.1.3 Interaktion von ZO1 mit CD8-positiven Zellen

In die Doppelfärbung mit ZO1-Antikörper und anti-CD8-Antikörper waren 20 Gewebeproben mit einbezogen. Davon waren 11 (55%) den Frühformen und 9 (45%) den Spätformen zugeteilt worden. Von den 20 ausgewerteten Proben zeigten 13 (65%) ein stark verbreitetes Expressionsmuster von ZO1 und 7 (35%) eine nur geringfügig verbreiterte ZO1-Expression.

Hier zeigt sich in Bezug auf die Eindringtiefe der CD8-positiven Zellen kein Unterschied zwischen geringer und stark verbreiteter Expression ($p=0,2226$) bzw. zwischen Früh- und Spätform ($p=0,6936$), wie Abbildung 13 und Abbildung 14 im Detail veranschaulichen.

Im Gegensatz zu den CD4-positiven Zellen findet man sehr viel weniger CD8-positive Zellen. In 10% der Früh- bzw. Spätformen konnte im entsprechenden Gewebeabschnitt keine CD8-positive Zelle beobachtet werden. Darüber hinaus waren in einem geringeren Anteil der Fälle Zellen bis ins Stratum granulosum vorgedrungen.

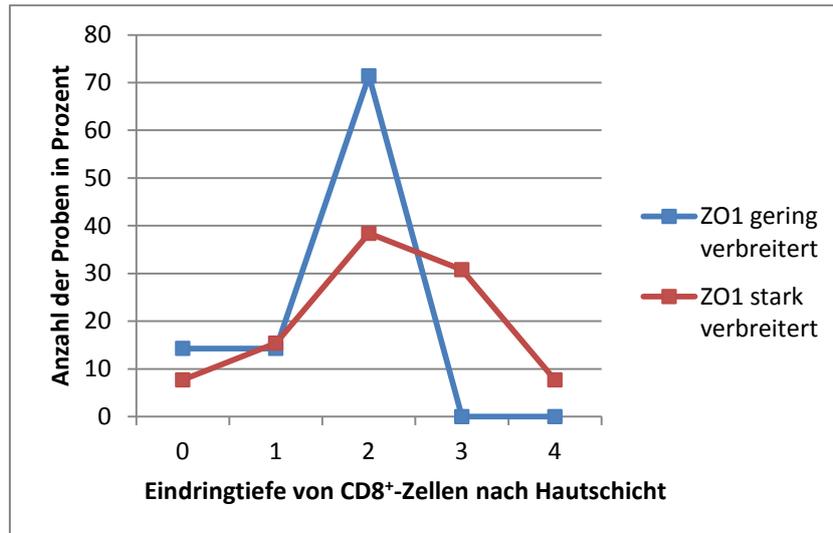


Abbildung 13. Zusammenhang zwischen Eindringtiefe CD8-positiver Zellen in die Haut und der verbreiterten Expression von ZO1

0: innerhalb des vorliegenden Hautausschnittes ist keine CD8-positive Zelle zu finden, 1: Infiltration von Zellen nur in der Dermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration in Dermis, Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum. ZO1 gering verbreitert: Stratum granulosum und oberes Stratum spinosum, ZO1 stark verbreitert: Stratum granulosum und gesamtes Stratum spinosum, teilweise sogar Stratum basale

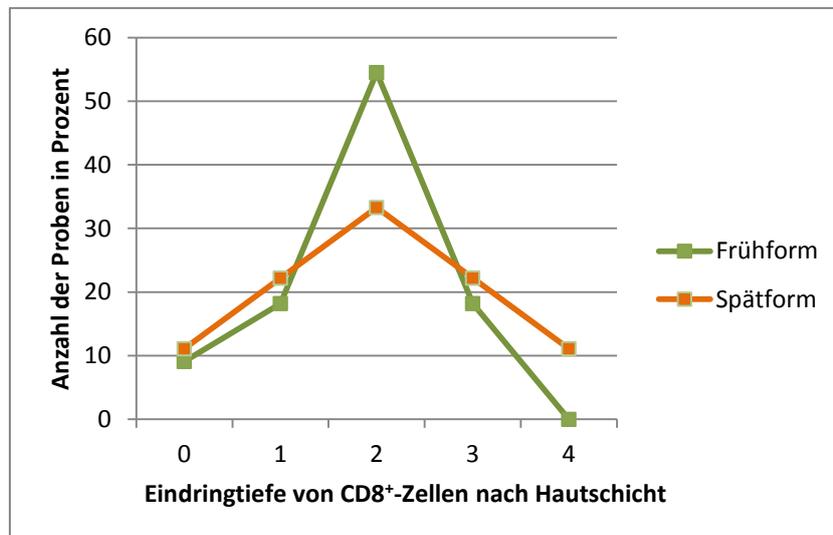


Abbildung 14. Zusammenhang zwischen Eindringtiefe CD8-positiver Zellen in die Haut und dem Stadium der Erkrankung

0: innerhalb des vorliegenden Hautausschnittes ist keine CD8-positive Zelle zu finden, 1: Infiltration von Zellen nur in der Dermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration in Dermis, Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum

Zur räumlichen Nähe von CD8-positiven Zellen und ZO1 kam es in 3 Fällen (15%), davon in einer Früh- und 2 Spätformen. In allen drei Fällen kam es nicht zu einer Veränderung der ZO1-Expression. (siehe Abbildung 15)

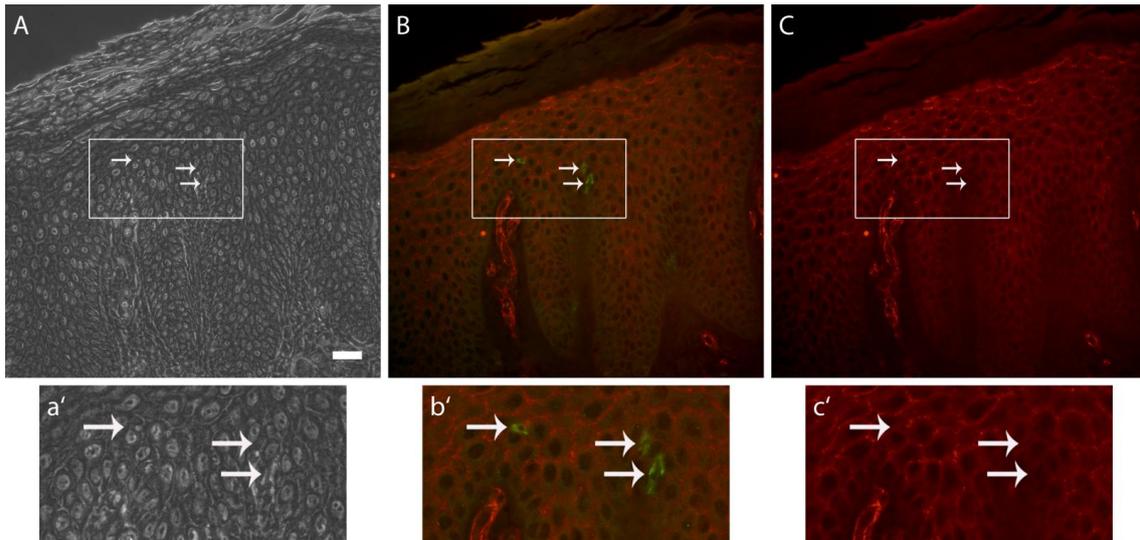


Abbildung 15. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 und CD8 in einer Spätform der Psoriasis
A: Phasenkontrastbild, **a'**: vergrößerter Ausschnitt aus A, **B:** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 (rot) und CD8 (grün), **b'**: vergrößerter Ausschnitt aus B, **C:** Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 (rot), **c'**: vergrößerter Ausschnitt aus C, die **Pfeile** zeigen auf CD8-Zellen, in deren Umgebung keine deutlich veränderte Expression von ZO1 gesehen werden kann; Längenmaßstab 50 μ m

4.2 Nicht gelungene Färbung mit IL-17- und IL-22-Antikörpern

Neben den regulatorischen T-Zellen, die durch FoxP3 als Marker identifiziert wurden, spielen in der Psoriasis weitere Subtypen der CD4-positiven Zellen eine wichtige Rolle. Zu diesen gehören die IL-17- und IL-22-positiven Th17-Zellen.

Leider war es nicht möglich, diese Antikörper im Rahmen dieser Arbeit mit den oben aufgeführten immunhistochemischen Methoden auf Paraffin zu etablieren. Der IL-17-Antikörper färbte unspezifisch das Endothel von Blutgefäßen an, jedoch nicht die gesuchten Immunzellen. Beim IL-22-Antikörper konnte keine Fluoreszenz gesehen werden. Die folgende Tabelle (Tabelle 1) zeigt, welche Versuche unternommen wurden abweichend von dem unter Kapitel 3.2.1.2 aufgeführten Protokoll die Färbung zu etablieren.

Tabelle 1. Übersicht des Etablierungsversuchs von IL-17 und IL-22

Mikrowellenzeiten bei 600 Watt:	2*10 Min. 3*10 Min.	
Mikrowellenpuffer:	Tec-Puffer Citrat-Puffer	
Trypsin:	0,0010% 0,010%	
„Blocklösung“:	Dako-Proteinblock 2% Magermilch 970 µl mit 20 µl NDS (normal donkey serum) 2% Magermilch 970 µl mit 20 µl NDS (normal donkey serum) und 10 µl Triton 5% Magermilch 970 µl mit 20 µl NDS (normal donkey serum) 5% Magermilch 970 µl mit 20 µl NDS (normal donkey serum) und 10 µl Triton	
Verdünnung der Primärantikörper IL-17:	in PBS:	Konzentrationen: 1:200 bis 1:600
	in DakoReal™ Antibody Diluent:	Konzentrationen: 1:200 bis 1:600
Verdünnung der Primärantikörper IL-22:	in PBS:	Konzentrationen: 1:50 bis 1:600
	in DakoReal™ Antibody Diluent:	Konzentrationen: 1:50 bis 1:600
Verdünnung des Sekundärantikörpers Cy3 goat:	in PBS:	Konzentrationen: 1:100 bis 1:600
	in Dako Antibody Diluent:	Konzentrationen: 1:100 bis 1:600
Verdünnung des Sekundärantikörpers Alexa 488 goat:	in PBS:	Konzentrationen: 1:400 bis 1:800
	in Dako Antibody Diluent:	Konzentrationen: 1:400 bis 1:800

4.3 Interaktion von Claudin-1 mit CD4- und FoxP3-positiven Zellen

Während in gesunder Haut Claudin-1 in allen Schichten exprimiert wird, findet sich in psoriatischer Haut eine Herabregulation vor allem in den basalen Epidermisschichten. Das folgende Diagramm (siehe Abbildung 16) zeigt die Lokalisation von Claudin-1 in 5 Spät- und 9 Frühformen.

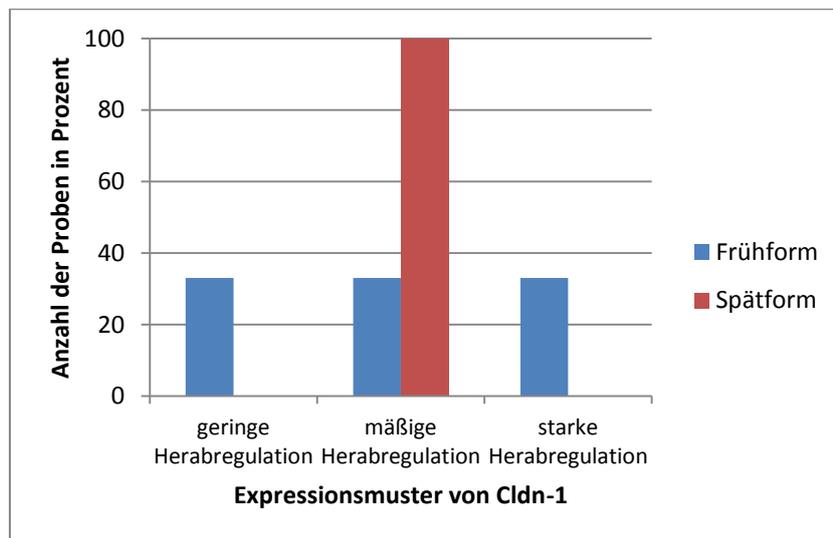


Abbildung 16. Zusammenhang zwischen Expression von Claudin-1 und Stadium der Erkrankung

geringe Herabregulation: Expression von Claudin-1 im gesamten Stratum spinosum und Stratum granulosum, mäßige Herabregulation: Expression von Claudin-1 im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum, starke Herabregulation: Expression von Claudin-1 im Stratum granulosum

Dies bedeutet, dass bei den Frühformen Cldn-1 immer im Stratum granulosum, nur noch bei zwei Drittel der Proben im oberen Stratum spinosum und nur noch bei einem Drittel im unteren Stratum spinosum zu finden war, während im Stratum basale Cldn-1 in keiner der Frühformen exprimiert wurde. Bei den Spätformen war Cldn-1 immer im Stratum granulosum und oberen Stratum spinosum zu sehen, wurde aber nicht mehr im unteren Stratum spinosum und im Stratum basale exprimiert. Beziffert man die geringe Herabregulation mit dem Zahlenwert 1, die mäßige mit 2 und die starke mit 3, so ergibt sich statistisch kein Unterschied zwischen Früh- und Spätform ($p=1,0000$).

4.3.1 Interaktion von Claudin-1 mit CD4-positiven Zellen

Insgesamt 18 Gewebeproben wurden in die Auswertung der Doppelfärbung mit Claudin-1-Antikörpern und CD4-Antikörpern einbezogen. Darunter befinden sich 10 Frühformen und 8 Spätformen. Von diesen zeigen 12 Proben einen oder mehrere Kontakte der CD4-positiven Zellen mit Claudin-1 (davon 7 (70%) von 10 Frühformen und 5 (62,5%) von 8 Spätformen). Es finden sich dabei Zellen, die eine Koexpression zeigen, die also sowohl CD4-positiv als auch Claudin-1-positiv sind. Bei einigen, allerdings nicht allen, rein CD4-positiven Zellen, also jenen, die keine Koexpression mit Claudin-1 aufweisen, kann eine lokale, direkt um die Zelle gelegene Herabregulation beobachtet werden. (siehe Abbildung 17)

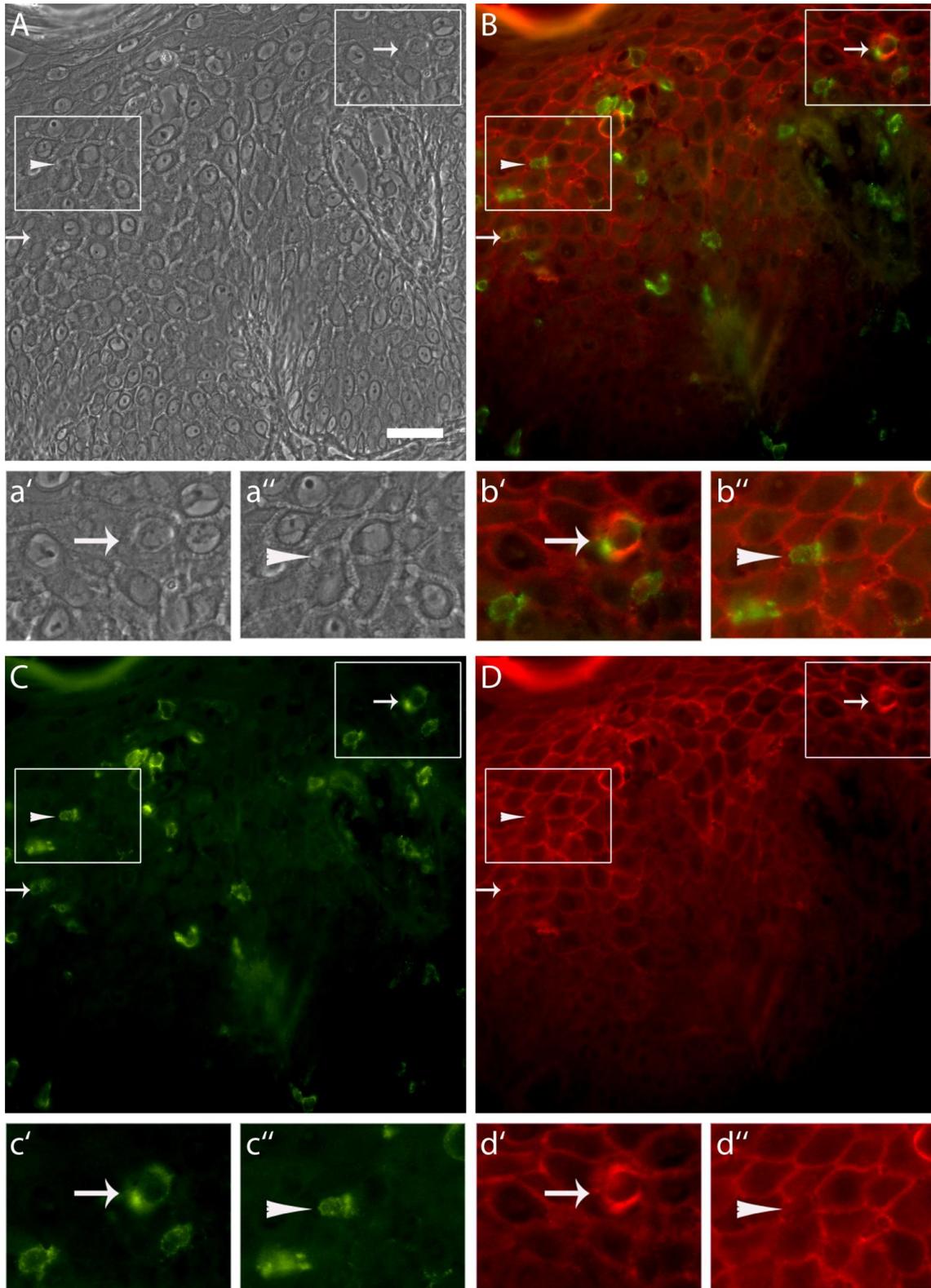


Abbildung 17. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 und CD4 in einer Spätform der Psoriasis - Bild 1

A: Phasenkontrastbild, **a` und a``**: vergrößerte Ausschnitte aus A, **B:** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen von Cldn-1 (rot) und CD4 (grün), **b` und b``**: vergrößerte Ausschnitte aus B, **C:** Immunfluoreszenzfärbung von CD4 (grün) zeigt die typische Zellmembranfärbung, **c` und c``**: vergrößerte Ausschnitte aus C, **D:** Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 (rot), **d` und d``**: vergrößerte Ausschnitte aus D, der **Pfeil** zeigt auf eine CD4-

positive Zelle, die eine Koexpression mit Cldn-1 aufweist, die **Pfeilspitze** zeigt auf eine CD4-positive Zelle, in deren unmittelbarer Umgebung eine Herabregulation von Cldn-1 zu sehen ist; Längenmaßstab 50 µm

Es ist auffallend, dass hinter manchen mitten im Netz Claudin-1-exprimierender Keratinozyten liegender CD-4-positiver Zellen, also auf dem Weg zwischen Dermis und der aktuellen Lage der Zelle in der Epidermis eine Herabregulation von Claudin-1 – ähnlich einer freigelegten Straße – zu sehen ist, wohingegen vor den Zellen, also in Richtung superfizial gelegener epidermaler Schichten, keine veränderte Expression zu beobachten ist. Diese „Straße“ ist aber nicht bei allen CD4-positiven Zellen zu sehen. (siehe Abbildung 18)

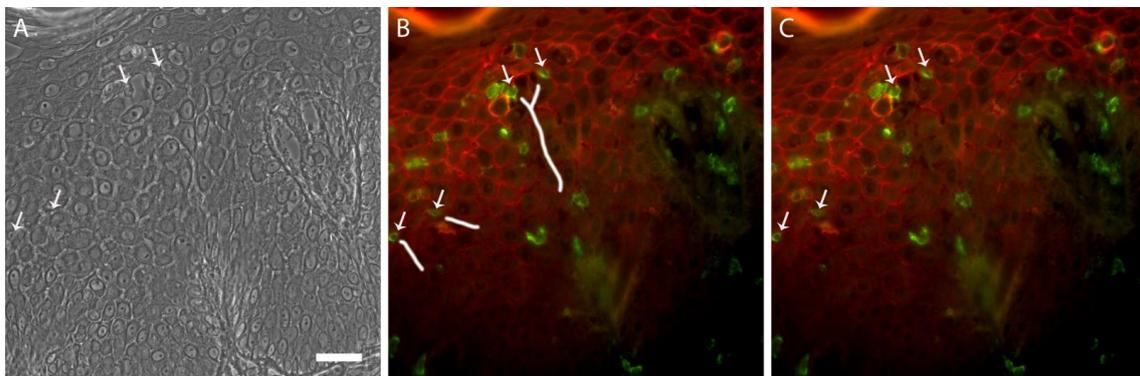


Abbildung 18. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 und CD4 in einer Spätform der Psoriasis - Bild 2

Das Bild entstammt derselben Gewebeprobe wie bei Abbildung 17. **A:** Phasenkontrastbild, **B:** Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 (rot) und CD4 (grün), die Pfeilspitzen zeigen auf CD4-positive Zellen, die **weiße Markierung** unterhalb dieser Zellen zeigt den Verlauf der Herabregulation von Cldn-1 und somit den mutmaßlichen Weg der Zelle durch die Epidermis **C:** Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 (rot) und CD4 (grün) ohne Markierung der Cldn-1-Herabregulation

Im Gegensatz zu den ZO1-Färbungen lässt sich hier kein Zusammenhang zwischen der Eindringtiefe der Zellen und der Expression von Claudin-1 herstellen. In den 17 ausgewerteten Proben, davon 13 mit verminderter und vier mit stark verminderter Expression, fanden sich CD4-positive Zellen unabhängig von der Stärke der Herabregulation der Claudin-Expression. Im Folgenden ist unter verminderter Expression zu verstehen, dass Claudin-1 im Stratum granulosum und Stratum spinosum exprimiert wird, unter stark verminderter Expression, dass Claudin-1 nur noch im Stratum granulosum exprimiert wird. Der Unterschied in der Verteilung der Zellen über die Hautschichten zwischen verminderter und stark verminderter Expression ist nicht signifikant ($p=0,6274$).

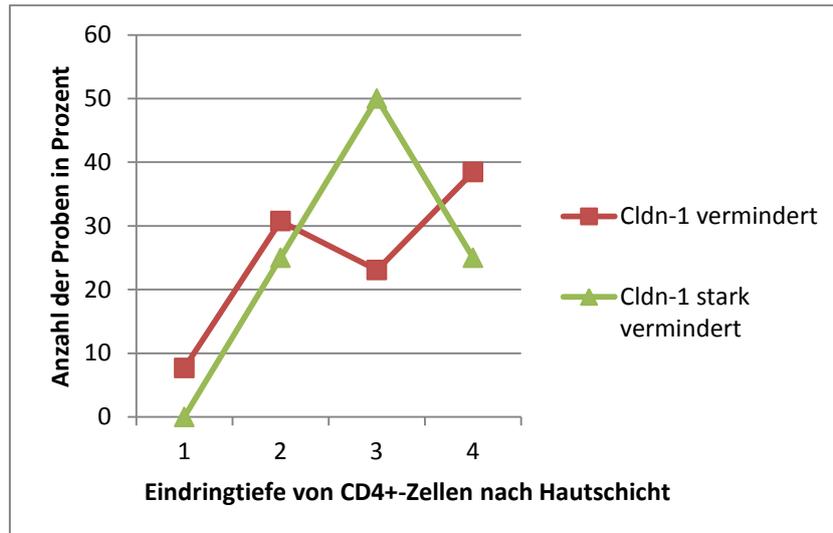


Abbildung 19. Zusammenhang zwischen Cldn-1-Expressionsmuster und Eindringtiefe CD4-positiver Zellen in die Haut

1: Infiltration von Zellen nur in die Dermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration in Dermis, Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum, Cldn-1 vermindert: Cldn-1 im Stratum granulosum und Stratum spinosum exprimiert, Cldn-1 stark vermindert: Cldn-1 nur noch im Stratum granulosum exprimiert

4.3.2 Interaktion von Claudin-1 mit FoxP3-positiven Zellen

Interessanterweise sind nicht alle CD4-positiven Zellen auch Claudin-1 positiv bzw. zeigen nicht alle CD4-positiven Zellen eine „Straße“ der Claudin-1-Herabregulation. Eine wichtige Subpopulation der CD4-positiven Zellen in der Psoriasis sind die regulatorischen T-Zellen. Um zu überprüfen, wie sich speziell FoxP3-positive regulatorische T-Zellen im Hinblick auf die Claudinexpression und -regulation verhalten, wurde eine FoxP3/ Claudin-1-Doppelfärbung durchgeführt. Für die Doppelfärbung mit Claudin-1-Antikörper und FoxP3-Antikörper konnten 14 Gewebeproben ausgewertet werden. Davon waren 9 den Frühformen und 5 den Spätformen zuzuordnen. Unter den Frühformen fanden sich bei 6 (66,7%) von 9 Proben FoxP3-positive Zellen in räumlicher Nähe mit Claudin-1, bei den Spätformen bei 4 (80%) von 5 Proben. Hierbei zeigte sich, dass auch eine Subpopulation der FoxP3-positiven Zellen Claudin-1 exprimieren. Diese Claudin-1-koexprimierenden Zellen wurden sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis gefunden (siehe Abbildung 20). Der überwiegende Anteil der FoxP3-positiven Zellen ist allerdings Claudin-1 negativ.

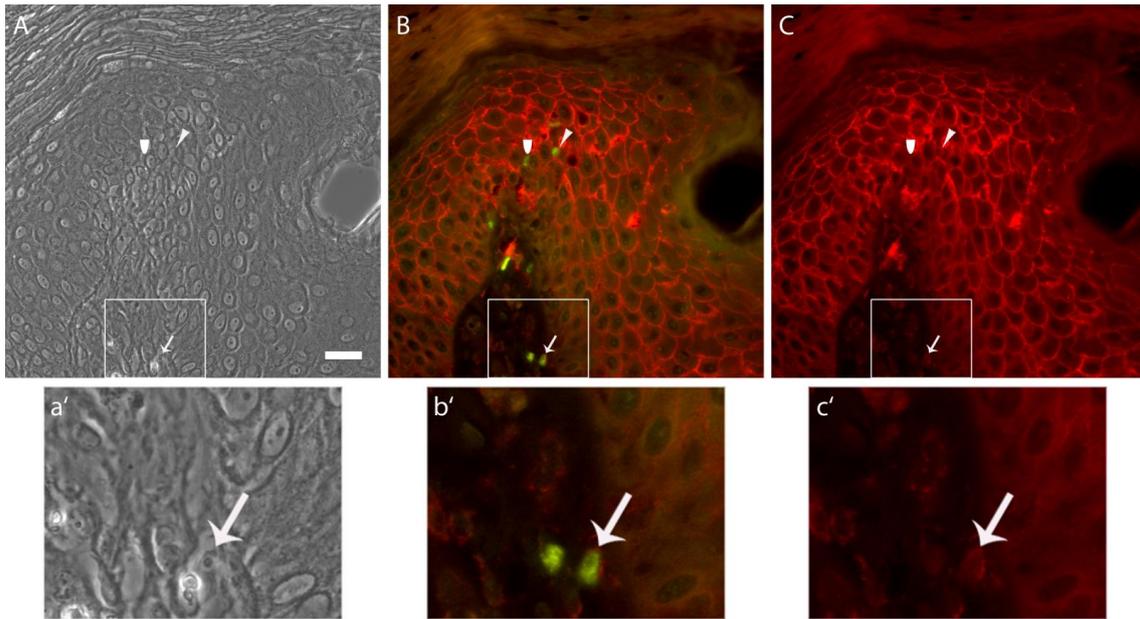


Abbildung 20. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 und FoxP3 in einer Spätform der Psoriasis - Bild 1

A: Phasenkontrastbild, **a'**: vergrößerter Ausschnitt aus A, **B:** Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 (rot) und FoxP3 (grün), **b'**: vergrößerter Ausschnitt aus B, **C:** Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 (rot), **c'**: vergrößerter Ausschnitt aus C, der **Pfeil** zeigt eine Zelle außerhalb der Epidermis, die neben FoxP3 (grün) auch Cldn-1 (rot) exprimiert, die **Pfeilspitze** zeigt eine Zelle innerhalb der Epidermis, die neben FoxP3 (grün) auch Cldn-1 (rot) exprimiert, die **Halbellipse** zeigt eine FoxP3-positive Cldn-1-negative Zelle; Längsmaßstab 50 µm

Es war auffallend, dass hinter allen Claudin-1-negativen FoxP3-positiven Lymphozyten auf dem Weg zwischen Dermis und der aktuellen Lage der Zelle in der Epidermis eine Herabregulation von Claudin-1 – ähnlich einer freigelegten Straße – zu sehen ist, wohingegen vor den Zellen, also in Richtung höhergelegener epidermaler Schichten, keine veränderte Expression zu beobachten ist. Während alle FoxP3-positiven Zellen, die kein Claudin-1 exprimieren, eine solche proximal der Zelle gelegene Herabregulation zeigen, fehlt bei den Claudin-1-positiven FoxP3-positiven Zellen diese Herabregulation. Sie sind von allen Seiten vom Claudin-Netz der Keratinozyten umgeben (siehe Abbildung 21).

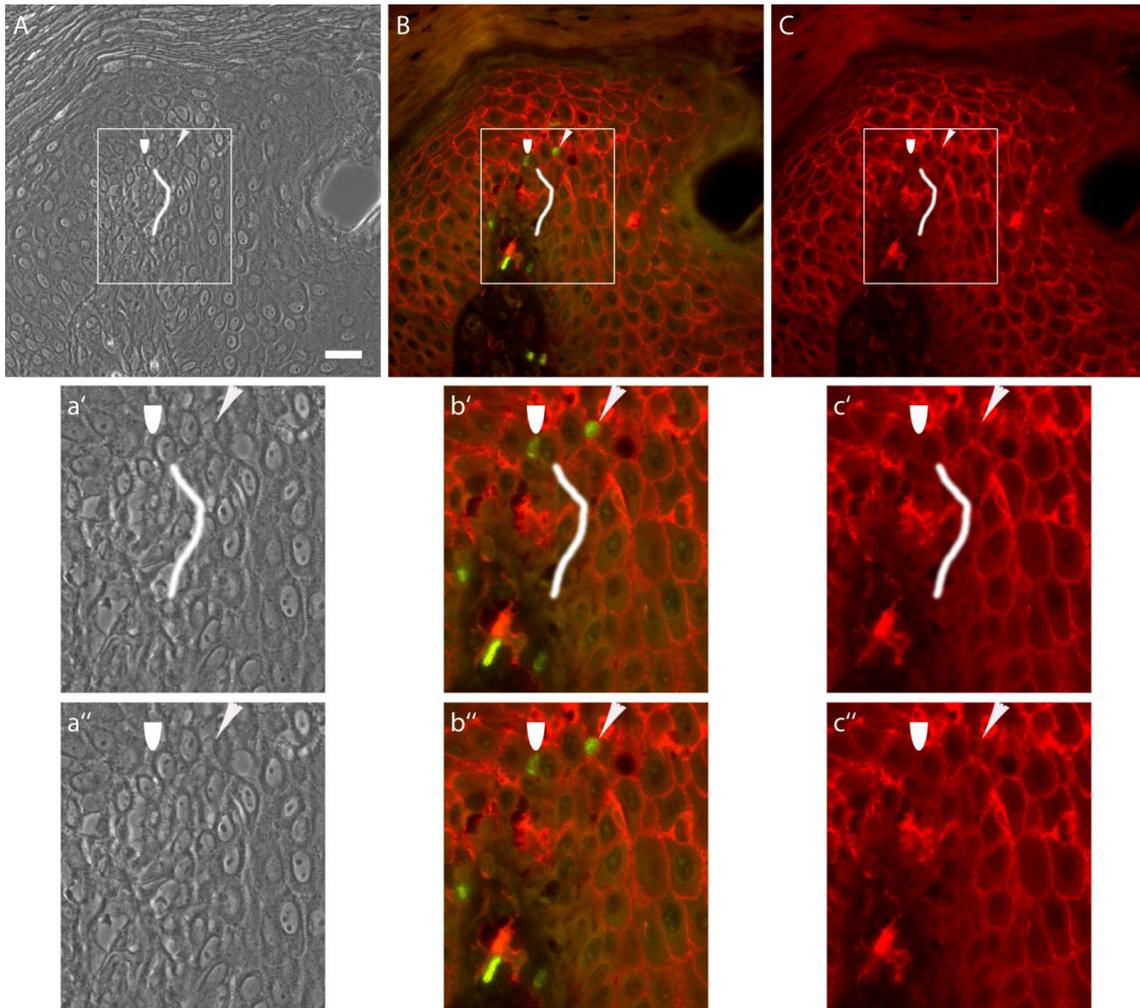


Abbildung 21. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 und FoxP3 in einer Spätform der Psoriasis - Bild 2

A: Phasenkontrastbild, **a'**: vergrößerter Ausschnitt aus A, **a''**: vergrößerter Ausschnitt aus A ohne Markierung der Cldn-1-Herabregulation, **B:** Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 (rot) und FoxP3 (grün), **b'**: vergrößerter Ausschnitt aus B, **b''**: vergrößerter Ausschnitt aus B ohne Markierung der Cldn-1-Herabregulation, **C:** Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 (rot), **c'**: vergrößerter Ausschnitt aus C, **c''**: vergrößerter Ausschnitt aus C ohne Markierung der Cldn-1-Herabregulation, die **Pfeilspitze** zeigt auf eine Claudin-1-positive FoxP3-positive Zelle, in deren Umgebung das Cldn-1-netzwerk nicht unterbrochen ist, die **Halbellipse** zeigt auf eine Claudin-1-negative FoxP3-positive Zelle mit proximal liegender Cldn-1-Herabregulation, die **weiße Markierung** unterhalb dieser Zelle zeigt den Verlauf der Herabregulation von Cldn-1 und somit den mutmaßlichen Weg der Zelle durch die Epidermis; Längenmaßstab 50 µm

Auch hier gibt es, wie auch schon bei den CD4-positiven Zellen, keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grad der verminderten Claudin-Expression und der Eindringtiefe der FoxP3-positiven Zellen in die Haut ($p=0,1683$). Zur Berechnung wurden 10 Proben mit verminderter und 4 Proben mit stark verminderter Expression herangezogen.

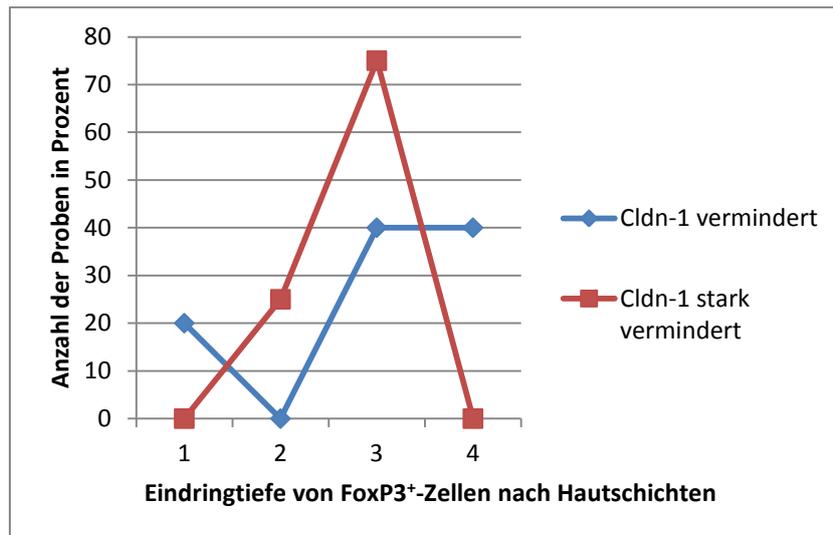


Abbildung 22. Zusammenhang zwischen Cldn-1-Expressionsmuster und Eindringtiefe FoxP3-positiver Zellen in die Haut

1: Infiltration von Zellen nur in die Epidermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration in Dermis, Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum

Da bislang die CD8-positiven Zellen bei den Färbungen keine Interaktion mit ZO-1 zeigten, wurde sowohl hier bei Cldn-1, als auch im Folgenden auf die Doppelfärbung mit CD8 verzichtet.

4.4 Interaktion von Occludin mit CD4- und FoxP3-positiven Zellen

4.4.1 Expression von Occludin in den Gewebeproben

Während in gesunder Haut die Lokalisation von Occludin auf das Stratum granulosum begrenzt ist, findet sich in psoriatischer Haut eine verbreiterte Expression, die ins Stratum spinosum reicht. Die folgende Abbildung (siehe Abbildung 23) veranschaulicht die Expression von Occludin in 7 Früh- und 10 Spätformen. Von den 7 Frühformen zeigen 3 (42,9%) eine normale Expression von Occludin, also nur im Stratum granulosum wie bei gesunder Haut, und 4 (57,1%) eine verbreiterte Expression ins Stratum spinosum. Bei den Spätformen zeigen nur noch 2 (20%) eine normale und 8 (80%) eine verbreiterte Expression. Wird für die normale Lokalisation der Zahlenwert 1 und für die verbreiterte Lokalisation der Zahlenwert 2 gesetzt, so gibt es im Vergleich zwischen Früh- und Spätformen keinen signifikanten Unterschied ($p=0,3394$).

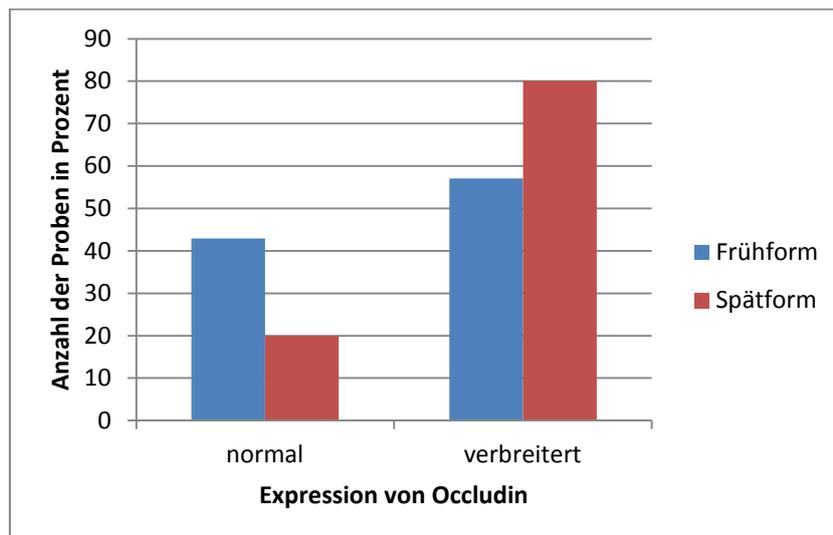


Abbildung 23. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Stadium der Erkrankung
 Normale Expression: Occludin findet sich nur im Stratum granulosum; verbreiterte Expression: Occludin findet sich im Stratum granulosum und Stratum spinosum

4.4.2 Interaktion von Occludin mit CD4-positiven Zellen

Die Doppelfärbung mit anti-Occludin mouse und CD4-Antikörpern wurde mit 21 Gewebeproben erfolgreich durchgeführt.

Dabei kam es zur räumlichen Nähe zwischen CD4-positiven Zellen und Occludin in insgesamt 6 Fällen (28,6%), wobei 2 (25%) den insgesamt 8 Frühformen und 4 (30,1%) den 13 Spätformen zuzuordnen sind. Eine gemeinsame Koexpression von CD4 und Occludin in einer Zelle konnte nicht beobachtet werden.

Das Expressionsmuster von Occludin zeigt keine Korrelation mit der Menge der CD4-positiven Zellen (Abbildung 24). So korreliert eine verbreiterte Expression beispielsweise über das gesamte Stratum spinosum nicht mit einer erhöhten Zellzahl an CD4-positiven Zellen.

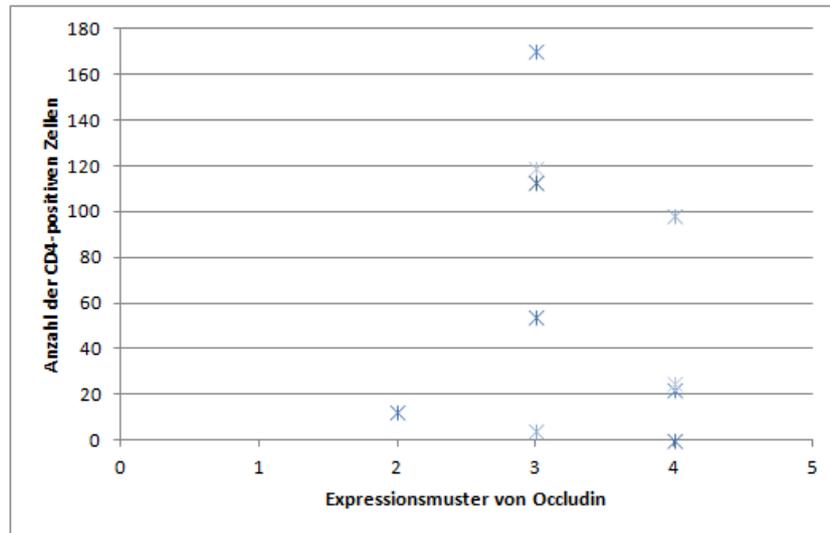


Abbildung 24. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Menge an CD4-positiven Zellen
 1: Occludin-Expression reicht bis ins Stratum basale, 2: Occludin wird im gesamten Stratum spinosum und Stratum granulosum exprimiert, 3: Occludin wird im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum exprimiert, 4: Occludin wird im Stratum granulosum exprimiert, 5: Occludin-Expression reicht bis ins Stratum corneum. Die einzelnen Messwerte stehen für verschiedene Psoriasis-Fälle.

Der Vergleich zwischen Eindringtiefe der Immunzellen und Expressionsmuster von Occludin gestaltet sich insofern schwierig, als dass in den meisten psoriatischen Plaques die Occludin-Expression leicht verbreitert, also im Stratum granulosum und oberen Stratum spinosum, zu finden war. Lediglich in drei der 18 ausgewerteten Proben war Occludin wie in gesunder Haut, also nur im Stratum granulosum, zu sehen und in vier Proben reichte die Expression sogar bis ins untere Stratum spinosum. Die Eindringtiefe der Immunzellen zeigte keine statistische Signifikanz im Vergleich zwischen normaler und insgesamt verbreiteter Expression ($p=0,3872$) und auch nicht im Vergleich zwischen verbreiteter und stark verbreiteter Expression ($p=0,0531$) sowie zwischen normaler und stark verbreiteter Expression ($p=0,5761$).

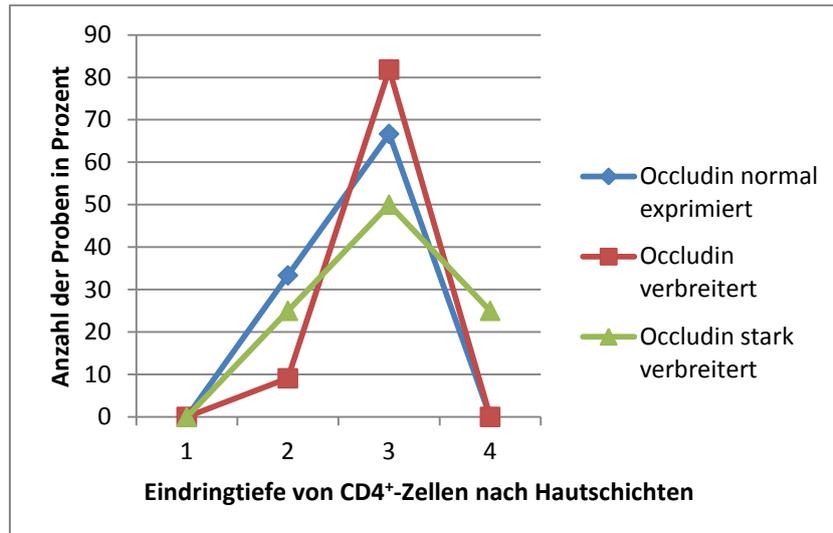


Abbildung 25. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Eindringtiefe CD4-positiver Zellen in die Haut

1: Infiltration von Zellen nur in die Epidermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration in Dermis, Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum. Occludin normal exprimiert: Stratum granulosum, Occludin verbreitert: Stratum granulosum und oberes Stratum spinosum, Occludin stark verbreitert: Stratum granulosum und gesamtes Stratum spinosum

Auffallend ist, dass die CD4-positiven Zellen immer proximal am Rand der Occludin-exprimierenden Keratinozyten liegen, niemals aber innerhalb des Occludin-exprimierenden Keratinozytenverbandes zu finden sind. Um die CD4-positiven Zellen jedoch findet sich eine lokale Herabregulation, die wie eine Einkerbung des Occludin-Netzes aussieht (siehe Abbildung 26).

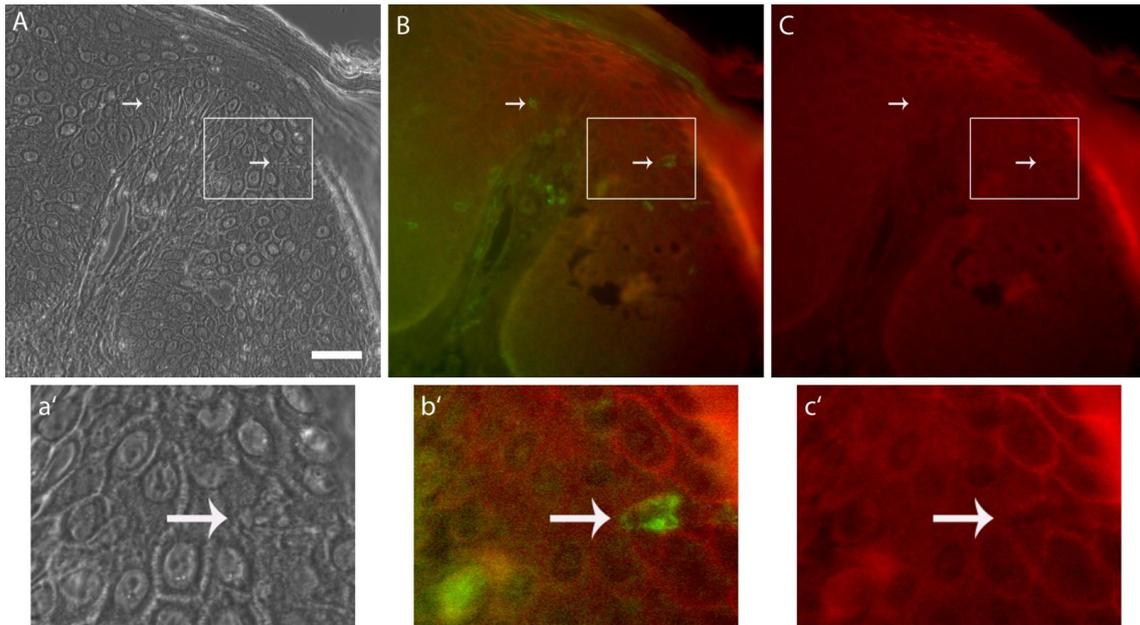


Abbildung 26. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Occludin und CD4 in einer Spätform der Psoriasis

A: Phasenkontrastbild, **a`:** vergrößerter Ausschnitt aus A, **B:** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen von Occludin (rot) und CD4 (grün), die **Pfeilspitzen** kennzeichnen CD4-positive Zellen, die auf den superfizial gelegenen Occludin-Verband treffen, **b`:** vergrößerter Ausschnitt aus B, **C:** Immunfluoreszenzfärbung von Occludin (rot) **c`:** vergrößerter Ausschnitt aus C, der die lokale Herabregulation von Occludin auf Höhe der CD4-positiven Zelle zeigt; Längenmaßstab 50 µm

4.4.3 Interaktion von Occludin mit FoxP3-positiven Zellen

Insgesamt 18 Gewebeproben wurden für die Doppelfärbung mit dem FoxP3-Antikörper und anti-Occludin rabbit gefärbt. Dabei handelt es sich um 10 Spät- und 8 Frühformen. 6 der 18 Proben (33%) zeigten eine nähere Lokalisation zwischen den FoxP3-Zellen und Occludin, wobei es sich um 4 Spät- und 2 Frühformen handelt. In allen anderen Fällen war der Abstand zwischen den Occludin-gefärbten Keratinozyten und den tiefer in der Haut liegenden FoxP3-positiven Zellen so groß, dass von keinem Zusammenhang zwischen den Zellen und dem Tight Junction-Protein Occludin ausgegangen werden konnte. Um einen höheren Kontrast zwischen Occludin-Färbung und Background zu erreichen mit dem Ziel, die Fotografierbarkeit zu erhöhen, und außerdem zum Ausschluss unspezifischer Färbungen, wurden diese sechs Proben nochmals mit dem anti-FoxP3-Antikörper und diesmal mit einem anti-Occludin goat Antikörper gefärbt. Diese Färbungen zeigten eindeutig, dass es nur in einer der gefärbten Proben zu einem direkten Kontakt zwischen FoxP3 und Occludin kommt. Dabei ist wie schon bei den CD4-positiven Zellen (siehe Kapitel 4.4.2) auffallend, dass niemals eine FoxP3⁺-Zelle innerhalb des mit dem Occludin-Antikörper angefärbten Keratinozytenverbandes liegt.

Bis auf eine der Spätform zuzuordnende Gewebeprobe, in der eine Zelle oberhalb der Occludin-exprimierenden Keratinozyten liegt (Pfeilspitze), lagen in allen anderen Gewebeproben alle Zellen unterhalb der Occludin-exprimierenden Keratinozyten. Die folgende Aufnahme zeigt die einzige FoxP3-positive Zelle mit direktem Occludin-Kontakt (Pfeil). Dieser führt nicht zu einer veränderten Expression von Occludin.

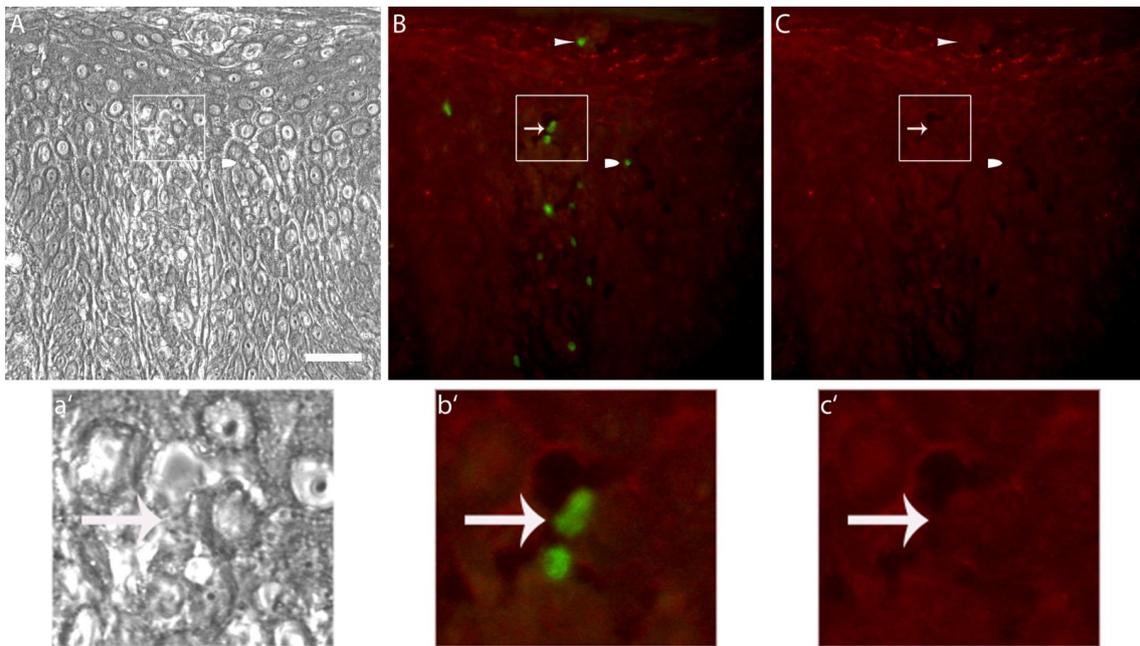


Abbildung 27. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Occludin und FoxP3 in einer Spätform der Psoriasis

A: Phasenkontrastbild, **a'**: vergrößerter Ausschnitt aus A, **B:** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen von Occludin (rot) und FoxP3 (grün), **b'**: vergrößerter Ausschnitt aus B, **C:** Immunfluoreszenzfärbung von Occludin (rot) **c'**: vergrößerter Ausschnitt aus C, die **Pfeilspitze** zeigt auf eine FoxP3-positive Zelle oberhalb der mit dem Occludin-Antikörper angefärbten Keratinozyten, der **Pfeil** zeigt auf eine FoxP3-positive Zelle, die mit einem Occludin-exprimierenden Keratinozyten in Kontakt ist ohne veränderte Occludin-Expression, die **Halbellipse** zeigt auf eine FoxP3-positive Zelle unterhalb der mit dem Occludin-Antikörper angefärbten Keratinozyten; Längenmaßstab 50 µm

Auch hier gibt es keinen Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und der Menge der FoxP3-positiven Zellen in der Epidermis (siehe Abbildung 28).

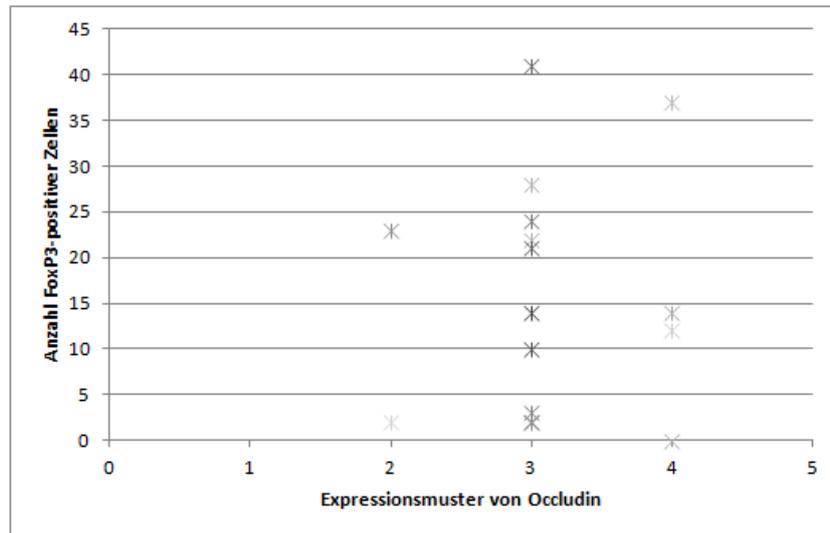


Abbildung 28. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Menge an FoxP3-positiven Zellen
 1: Occludin-Expression reicht bis ins Stratum basale, 2: Occludin wird im gesamten Stratum spinosum und Stratum granulosum exprimiert, 3: Occludin wird im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum exprimiert, 4: Occludin wird im Stratum granulosum exprimiert, 5: Occludin-Expression reicht bis ins Stratum corneum. Die einzelnen Messwerte stehen für verschiedene Psoriasis-Fälle.

Vergleicht man die Eindringtiefe der FoxP3-positiven Zellen mit dem Expressionsmuster von Occludin, so zeigt sich wie bereits bei den CD4-positiven Zellen kein Zusammenhang. Von den 15 ausgewerteten Proben zeigten erwartungsgemäß die meisten ein verbreitertes Expressionsmuster (10 Proben), bei vier Proben war die Expression bis ins untere Stratum spinosum verbreitert und nur eine Probe zeigte ein normales Expressionsmuster wie es in gesunder Haut zu finden ist. Die Eindringtiefe der FoxP3-positiven Zellen beeinflusste dies nicht. So fanden sich beispielsweise in der einen Probe mit normaler aber auch in einer Probe mit stark verbreiteter Expression FoxP3-positive Zellen nur in der Dermis, auch fanden sich sowohl bei verbreiteter als auch bei stark verbreiteter Expression am häufigsten die Zellen bis im Stratum spinosum. Folglich gibt es bei der Eindringtiefe der Zellen im Vergleich zwischen verbreiteter versus stark verbreiteter Expression keine statistische Korrelation ($p=0,1425$).

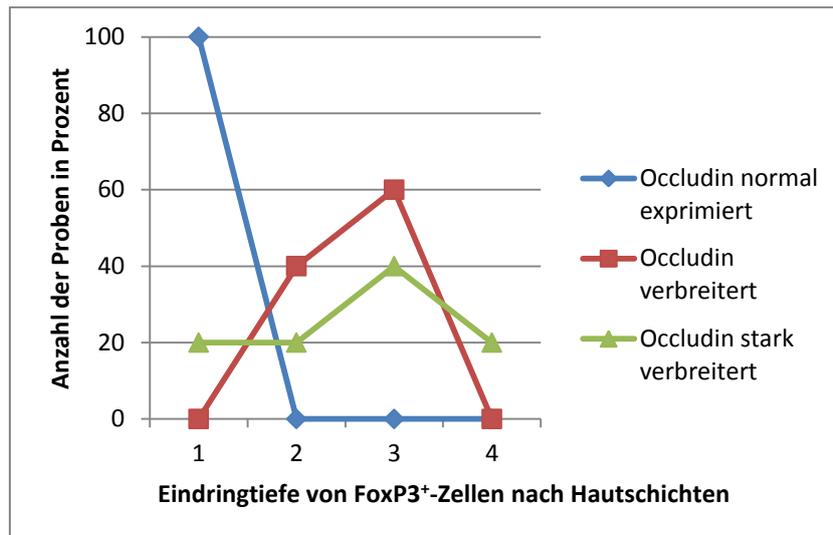


Abbildung 29. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Eindringtiefe FoxP3-positiver Zellen in die Haut

1: Infiltration von Zellen nur in die Dermis, 2: Infiltration in Dermis und Stratum basale, 3: Infiltration in Dermis, Stratum basale und Stratum spinosum, 4: Infiltration in Dermis, Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum granulosum. Occludin normal exprimiert: Stratum granulosum, Occludin verbreitert: Stratum granulosum und oberes Stratum spinosum, Occludin stark verbreitert: Stratum granulosum und gesamtes Stratum spinosum

4.5 Expression von CAR in gesunder und psoriatischer Haut und seine Interaktion mit JAML-positiven Zellen

Um das Spektrum der TJ-assoziierten Proteine in der Epidermis und ihre Veränderungen in der Psoriasis zu erweitern, wurde der Coxsackie- and Adenovirus Receptor (CAR) untersucht. Das Vorhandensein von CAR in der Haut ist bedeutsam, da seine Interaktion mit JAML zur Migration von Neutrophilen und $\gamma\delta$ -T-Zellen dient. Bisher wurde nur seine Anwesenheit in epidermalen Keratinozyten, nicht aber seine Lokalisation gezeigt. In gesunder humaner Haut zeigt sich eine durchgehende membranständige Färbung, die sich immer im Stratum basale, in manchen Proben auch im Stratum spinosum findet. Beim Vergleich der Lokalisation von CAR zwischen belichteter und unbelichteter Haut kann man einen leichten Verlust der CAR-Expression in belichteter Haut feststellen. So findet sich in belichteter Haut CAR seltener durchgehend im Stratum spinosum und Stratum basale. Dadurch entstehen in belichteter Haut häufiger Gewebeabschnitte, die überhaupt keine CAR-Färbung mehr aufweisen, beziehungsweise eine Ausdünnung der CAR-Färbung zeigen. Neben der durchgehenden membranständigen Färbung zeigen sich vereinzelt Felder mit intrazellulärer CAR-Lokalisation. Die Lokalisation von CAR zeigt keine Korrelation in Bezug auf die Zahl der möglichen Interaktionspartner, der JAML-positiven Zellen. Diese sind in gesunder Haut in unterschiedlicher Menge vorhanden, ihre Menge korreliert aber nicht mit der Sonnenexposition.

Das folgende Bild (siehe Abbildung 30) zeigt eine membranständige Färbung, die sich in der gesamten Gewebeprobe durchgehend über das gesamte Stratum basale zieht und stellenweise auch im Stratum spinosum zu finden ist.

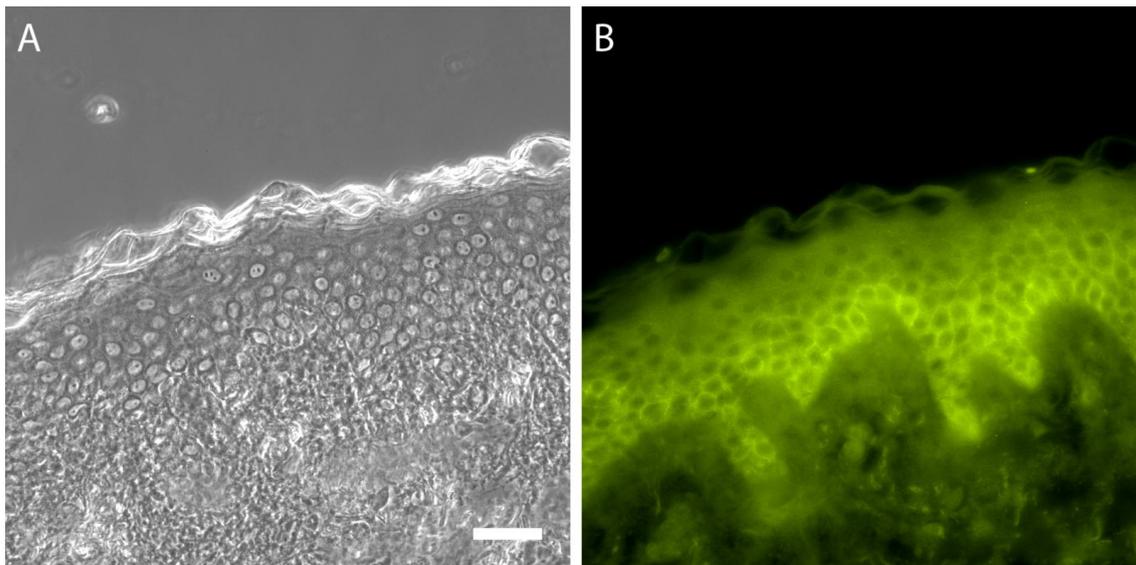


Abbildung 30. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von CAR in gesunder Haut
Bild entstammt Gewebeprobe uH-4: **A:** Phasenkontrastbild, **B:** Immunfluoreszenzfärbung von CAR (grün), in diesem Gewebeabschnitt finden sich keine JAML-positiven Zellen in der Epidermis; Längenmaßstab 50 µm

Die unten stehenden Tabellen (Tabelle 2 und Tabelle 3) zeigen die Lokalisation von CAR in den einzelnen epidermalen Schichten und die Menge an JAML-positiven Zellen in den einzelnen Färbungen in gesunder Haut.

Tabelle 2. Vorkommen von CAR und JAML-positiven Zellen in gesunder unbelichteter Haut

Nummer	Vorkommen von CAR:					JAML
	Str. basale	unteres Str. spinosum	oberes Str. spinosum	Str. granulosum	durchgehende membranständige Färbung	Menge
uH-1	(+)	-	-	-	+	-
uH-2	+	(+)	(+)	-	+	+
uH-3	+	+	+	-	+	-
uH-4	+	-	-	-	+	+
uH-5	+	+	-	-	+	+

Tabelle 3. Vorkommen von CAR und JAML-positiven Zellen in gesunder belichteter Haut

Nummer	Vorkommen von CAR:					JAML
	Str. basale	unteres Str. spinosum	oberes Str. spinosum	Str. granulosum	durchgehende membranständige Färbung	Menge
bH-1	(+)	(+)	-	-	+	-
bH-2	+	(+)	-	-	+	+
bH-3	(+)	(+)	(+)	-	+	+
bH-4	+	(+)	-	-	+	+
bH-5	(+)	-	-	-	+	-

uH=unbelichtete Haut, bH=belichtete Haut, + in dieser Epidermisschicht ist CAR durchgehend vorhanden, (+) CAR ist nur stellenweise in dieser Epidermisschicht vorhanden, - CAR ist nicht vorhanden, + CAR zeigt überwiegend eine membranständige Färbung, + vereinzelt kommen JAML-positive Zellen vor, - es sind keine JAML-positiven Zellen in der Epidermis zu finden

In psoriatischer Haut zeigt sich CAR überwiegend ganz anders: die durchgehende fluoreszierende Linie der CAR-Färbung ist ständig unterbrochen, was ein zerklüftetes oder zerfressenes Erscheinungsbild der Färbung ergibt. Zunehmend färben sich auch intrazelluläre Zellanteile bis hin zu einer völlig konturenlosen fleckigen Färbung (siehe Abbildung 31). Diese Form der Färbung findet sich vor allem dort, wo viele JAML-positive Zellen in die Epidermis eingewandert sind. Darüber hinaus ist diese veränderte Form der CAR-Färbung in psoriatischer Haut nicht mehr nur auf Stratum basale und Stratum spinosum beschränkt, sondern erstreckt sich stellenweise über die gesamte Epidermis.

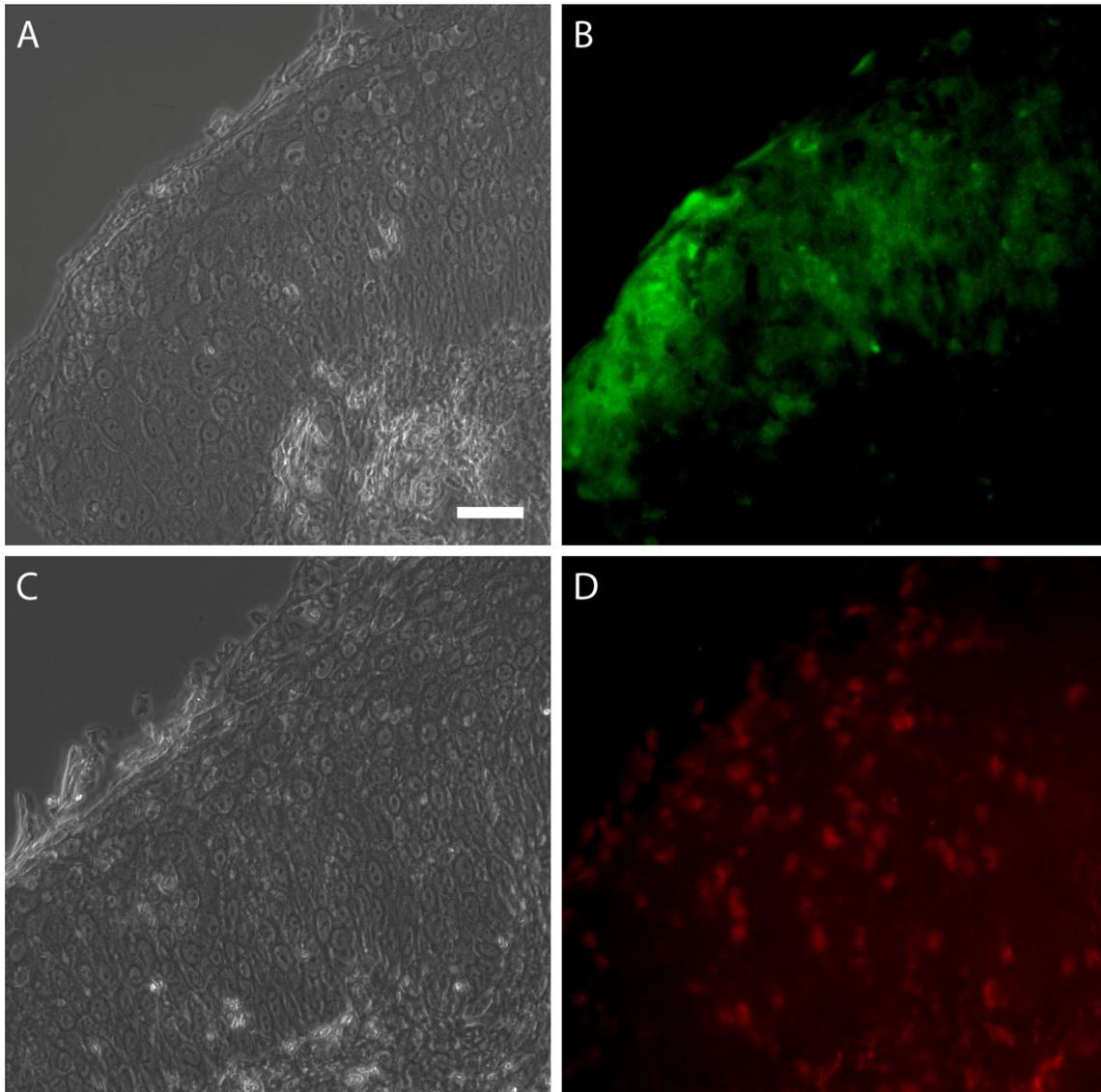


Abbildung 31. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von CAR in einem psoriatischen Plaque (Frühform) bei Anwesenheit vieler JAML-positiver Zellen
Bild entstammt Gewebeprobe F-2: A: Phasenkontrastbild von B, **B:** Immunfluoreszenzfärbung von CAR (grün) mit für die Psoriasis typischer fleckiger und konturenloser Färbung, **C:** Phasenkontrastbild von D, **D:** Immunfluoreszenzfärbung von JAML (rot) mit vielen angefärbten Zellen; die Färbungen entstammen Folgeschnitten; Längenmaßstab 50 µm

Dieselbe Gewebeprobe weist an einer Stelle mit wenigen JAML-positiven Zellen eine etwas konturenklarere, zellmembranbegrenztere Färbung auf (s. Abbildung 32).

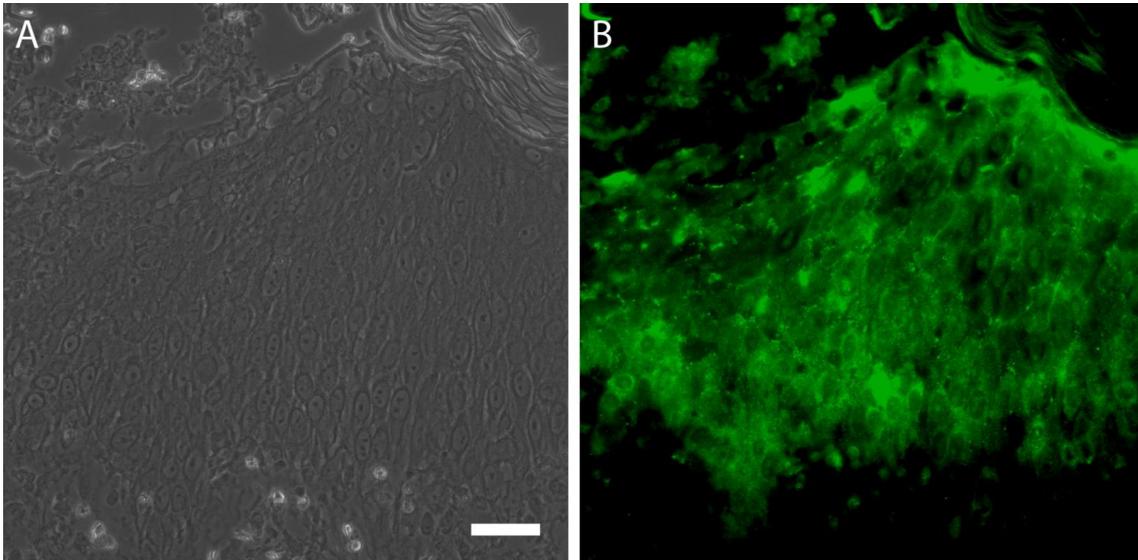


Abbildung 32. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von CAR in einem psoriatischen Plaque (Frühform) bei Abwesenheit JAML-positiver Zellen

Bild entstammt Gewebeprobe F-2: A: Phasenkontrastbild von B, **B:** Immunfluoreszenzfärbung von CAR (grün); an dieser Stelle sind keine JAML-Zellen vorhanden; die CAR-Färbung zeigt noch andeutungsweise eine membranständige Fluoreszenz mit zusätzlich gefärbten zytoplasmatischen Anteilen; Längenmaßstab 50 µm

Diese zerklüftete Färbung von CAR findet sich in allen vier untersuchten Frühformen und in drei der vier Spätformen. Weiterhin fällt auf, dass in allen vier psoriatischen Frühformen viele JAML-positive Zellen zu finden sind, bei den Spätformen sind jedoch nur noch in der Hälfte der Proben viele JAML-positive Zellen vorhanden.

Die folgenden Tabellen (Tabelle 4 und Tabelle 5) zeigen die Lokalisation von CAR in den einzelnen epidermalen Schichten und die Menge an JAML-positiven Zellen in den einzelnen Färbungen in psoriatischer Haut.

Tabelle 4. Vorkommen von CAR und JAML-positiven Zellen bei Frühformen der Psoriasis

Nummer	Vorkommen von CAR:					JAML
	Str. basale	unteres Str. spinosum	oberes Str. spinosum	Str. granulosum	durchgehende membranständige Färbung	Menge
F-1	+	(+)	(+)	-	-	++
F-2	+	+	+	-	-	++
F-3	+	+	+	+	-	++
F-4	+	+	(+)	-	-	++

Tabelle 5. Vorkommen von CAR und JAML-positiven Zellen bei Spätformen der Psoriasis

Nummer	Vorkommen von CAR:					JAML
	Str. basale	unteres Str. spinosum	oberes Str. spinosum	Str. granulosum	durchgehende membranständige Färbung	Menge
S-1	(+)	(+)	-	-	+	+
S-2	(+)	-	-	-	+	-
S-3	+	+	+	+	-	++
S-4	+	(+)	-	-	-	++

F=Frühform, S=Spätform, + in dieser Epidermisschicht ist CAR durchgehend vorhanden, (+) CAR ist nur stellenweise in dieser Epidermisschicht vorhanden, - CAR ist nicht vorhanden, + CAR zeigt überwiegend eine membranständige Färbung, - CAR zeigt überwiegend intrazelluläre Färbung, ++ es sind sehr viele JAML-positive Zellen zu sehen, + vereinzelt kommen JAML-positive Zellen vor, - es sind keine JAML-positiven Zellen in der Epidermis zu finden

5 Diskussion

5.1 Für die Pathogenese der Psoriasis relevante Tight Junction-Proteine

Tight Junctions dienen in Epithelien und Endothelien als Barrieren (Dragsten et al., 1981, van Meer and Simons, 1986). Darüber hinaus sind Tight Junction-Proteine aber auch wichtig für Proliferation und Differenzierung (Matter et al., 2005) sowie für Adhäsion und Apoptose (Rachow et al., 2013). Da in läsionaler psoriatischer Haut die Barrierefunktion aber auch Proliferation und Differenzierung gestört sind, liegt es nahe, die Rolle der Tight Junction-Proteine bei dieser Erkrankung zu untersuchen.

Bereits in früheren Arbeiten wurde für die Tight Junction-Proteine ZO1 und Occludin eine verbreiterte Expression beim Spättyp der Psoriasis (Plaques-Typ) beschrieben (Pummi et al., 2001, Yoshida et al., 2001, Brandner et al., 2006, Kirschner et al., 2009). Kirschner et al. konnten zeigen, dass die veränderten Expressionen dieser Tight Junction-Proteine auch schon in der Frühform der Psoriasis vorhanden sind, allerdings wurde in diesen Arbeiten nicht systematisch untersucht, ob dies in allen Früh- bzw. Spätformen der Fall ist. In der vorliegenden Arbeit konnte ich die bereits beobachtete verbreiterte Expression von ZO1 und Occludin bestätigen. Für ZO1 konnte ich darüber hinaus zeigen, dass tatsächlich in allen Früh- bzw. Spätformen eine verbreiterte Expression von ZO1 zu beobachten ist. Diese Verbreiterung ist unterschiedlich stark ausgeprägt, allerdings korreliert dies nicht mit dem Vorhandensein der Früh- oder Spätform, sondern mit der Eindringtiefe und der Anzahl CD4-positiver Zellen, vor allem regulatorischer T-Zellen.

Für Occludin konnte ich zeigen, dass in 42,9% der Frühformen (n=3) und 20% der Spätformen (n=2) keine Veränderung im Vergleich zu normaler Haut gefunden wird. Das zeigt, dass nicht alle psoriatischen Proben Veränderungen von Occludin zeigen, und dass diese Veränderungen für ZO1 ausgeprägter sind. Es gibt eine Tendenz der häufigeren Verbreiterung der Occludin-Färbung in der Spätform, dies ist aber nicht statistisch signifikant.

Für Claudin-1 wurden in der Literatur unterschiedliche Veränderungen beschrieben, so wurden Herabregulationen beschränkt auf die oberen und unteren Schichten gefunden (Brandner et al., 2006), starke Herabregulationen in allen Schichten (Watson et al.,

2007) bis hin zu keinen Veränderungen (Peltonen et al., 2007). Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, dass eine Herabregulation in den unteren Schichten in allen Früh- und Spätformen zu beobachten war. Allerdings fand man in den Frühformen in 33% der Fälle (n=3) nur eine Herabregulation im Stratum basale, während in der Spätform in allen Fällen (n=5) eine Herabregulation im Stratum basale und im unteren Stratum spinosum zu beobachten war. Allerdings ist die Ausprägung der Herabregulation bei den Frühformen sehr variabel, so konnte bei einem Drittel der Frühformen (n=3) auch eine verstärkte Herabregulation gesehen werden, sodass Claudin-1 nur noch im Stratum granulosum exprimiert wurde. Es ist aber nicht auszuschließen, dass sowohl für Occludin, als auch für Claudin-1 bei einer weiteren Erhöhung der Fallzahl ein signifikanter Unterschied zwischen Früh- und Spätform gesehen werden könnte.

In ihrer Dissertation konnte Nina Kirschner zeigen, dass in psoriatischen Hautproben Tight Junctions intakte Barrieren bilden. Allerdings liegt diese Barriere nicht wie in gesunder Haut in der obersten lebenden Schicht, sondern in tieferen Schichten der Epidermis, dort, wo man eine Kolo-kalisation von TJ-Proteinen vorfand (Kirschner, 2010). Interessant wäre für die Zukunft nun, Proben von Patienten mit unterschiedlicher Ausprägung der Veränderung der TJ-Proteine zu untersuchen, und zu sehen, wie sich dies auf die Lokalisation der TJ-Barriere auswirkt.

5.2 Interaktionen zwischen Tight Junction-Proteinen und Immunzellen und ihre mögliche Bedeutung

Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, dass die verbreiterte Expression von ZO1 signifikant mit der Eindringtiefe von CD4-positiven Zellen im Allgemeinen und FoxP3-positiven Zellen im Speziellen korreliert. Darüber hinaus korreliert es auch mit der Anzahl FoxP3-positiver Zellen. Dahingegen konnte ich keine Korrelation zwischen der Zahl CD4-positiver bzw. FoxP3-positiver Zellen und der verbreiteten Expression von Occludin beobachten. Auch für die Claudin-1-Expression konnte keine Korrelation zur Eindringtiefe oder Zellzahl gefunden werden.

5.2.1 Interaktion der T-Lymphozyten mit ZO1

Ein auffallender Zusammenhang besteht zwischen der Expression von ZO1 und CD4⁺-Zellen. Hier korreliert das Expressionsmuster mit der Eindringtiefe der Zellen in die epidermalen Schichten, was bedeutet, dass die CD4⁺-Zellen nur dann in höher gelegenen Schichten zu finden sind, wenn die Expression von ZO1 verbreitert ist. Bei

gering verbreiteter ZO1-Expression dringen die CD4⁺-Zellen nur bis maximal ins Stratum basale vor. Dies könnte darauf hin deuten, dass die Zellen leichter durch das Epithel migrieren können, wenn ZO1 vermehrt vorhanden ist. Ebenso ist es aber auch möglich, dass das Eindringen der CD4⁺-Zellen einen Einfluss auf die ZO1-Expression hat, was bedeuten würde, dass die ZO1-Expression umso breiter ist, je mehr CD4⁺-Zellen in der Epidermis sind und je weiter die Eindringtiefe der Zellen ist.

Liegen ZO1 und CD4 in direkter Nähe, so kommt es in zwei Drittel der Fälle zur Unterbrechung der ZO1-Expressionslinie. Auch wenn in einem Drittel der direkten Kontakte keine Herabregulation zu sehen ist, hinterlässt eine größere Anzahl an CD4⁺-T-Zellen das Bild einer Zerstückelung des ZO1-Musters.

Da die FoxP3-positiven Zellen eine Subpopulation der CD4⁺-Zellen darstellen, macht es Sinn, diese Zellen im Kontext der Ergebnisse für die CD4⁺-Zellen zu betrachten. FoxP3-positiv Zellen sorgen in ihrer Umgebung generell für eine Herabregulation von ZO1. Sie gehören also zu den zwei Dritteln der CD4⁺-Zellen, die ZO1 herabregulieren. Allerdings scheint es neben den FoxP3-positiven Zellen noch andere Subtypen CD4-positiver Zellen zu geben, die an der Herabregulation von ZO1 beteiligt sind. Um welche Subpopulationen es sich dabei handelt, sollte Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

Es stellt sich nun zum einen die Frage nach dem Mechanismus, wie FoxP3-positiv Zellen bzw. CD4-positiv Zellen ZO1 herabregulieren, zum anderen, was dies für Konsequenzen für die Zelle hat. Da es sich bei ZO1 um ein zytoplasmatisches Molekül handelt, ist es unwahrscheinlich, dass von den T-Lymphozyten abgegebene Proteasen zu der Herabregulation führen. Wahrscheinlicher ist die Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren und einer anschließenden Beeinflussung von ZO1. Dies sollte in weiteren Arbeiten geklärt werden.

Balda et al. (Balda et al., 2003) fanden einen Zusammenhang zwischen ZO1 und der Proliferation von MDCK-Zellen, einer epithelialen Zelllinie aus der Niere des Hundes. Sie fanden einen Transkriptionsfaktor, ZONAB, dessen Heraufregulation zu einer erhöhten Proliferation führt. Die Menge nukleären ZONABs wird über die Bindung an ZO1 reduziert, was zur erniedrigten Proliferation führt. Dies könnte zeigen, dass die CD4-positiven und die FoxP3-positiven Zellen durch die Verminderung von ZO1 über diesen ZONAB/ZO1-pathway die Proliferation fördern und auf diesem Weg zum

klinischen Erscheinungsbild der Psoriasis beitragen. Kirschner et al. (Kirschner et al., 2013) konnten zeigen, dass ZO1 wichtig ist für die Barrierefunktion von Keratinozyten gegenüber Ionen sowie kleinen und großen Molekülen bis zu 40 kDa. Somit kann vermutet werden, dass ZO1 wichtig ist für die Barrierefunktion von noch größeren Strukturen und damit auch von Entzündungszellen. Eine Herabregulation würde somit dafür sprechen, dass sich die CD4-positiven Zellen einen Weg durch die TJs gebahnt haben.

Im Gegensatz dazu haben die CD8⁺-Zellen keinen Einfluss auf die ZO1-Färbung. Weder kommt es zu einer unterschiedlichen Lokalisation der Zellen in der Epidermis bei unterschiedlich stark ausgeprägter ZO1-Expression, noch lassen sich Veränderungen im Umfeld der Zellen erkennen. Auf Grund der Schwierigkeiten bei den Färbungen mit dem CD8-Antikörper und aufgrund fehlender relevanter Ergebnisse bei der Doppelfärbung mit ZO1 wurde auf weitere Färbungen mit dem CD8-Antikörper verzichtet.

5.2.2 Interaktion der T-Lymphozyten mit Claudin-1

Die Färbung mit dem Claudin-1-Antikörper und CD4⁺-Antikörper zeigt, dass es Zellen gibt, die sowohl Claudin-1 als auch CD4 exprimieren. Eine Herabregulation von Claudin-1 auf den Keratinozyten findet sich nur in der Umgebung ausschließlich CD4-exprimierender T-Zellen. In der Umgebung koexprimierender T-Zellen ist Claudin-1 nicht herunterreguliert. Dies lässt darauf schließen, dass die Koexpression eine Möglichkeit sein könnte, durch das Epithel zu migrieren und dabei möglichst wenige Veränderungen an den Zell-Zell-Verbindungen der Keratinozyten zu bewirken. Ähnliches wurde bereits zuvor bei der Migration von Occludin-präsentierenden T-Lymphozyten beobachtet, die bei ihrer Diapedese durch Endothelien nur minimale Effekte an den TJs und deren Funktion hervorriefen (Alexander et al., 1998). Auf dem Weg durch die Epidermis hinterlassen einige, aber nicht alle, CD4⁺-Zellen – einer Straße ähnlich – eine Herabregulation von Claudin-1. Diese Herabregulation des Transmembranproteins Claudin-1 könnte durch Proteasen verursacht werden, die vom T-Lymphozyten sezerniert werden. Beispielsweise wurde in der perineuralen Barriere gezeigt, dass MMP-9 Claudin-1 herabregulieren kann (Hackel et al., 2012). Darüber hinaus könnten Zytokine eine wichtige Rolle spielen. Ein Merkmal der Psoriasis ist die Produktion von INF- γ und TNF- α durch aktivierte, dem T-Helfer-Zell-Typ Th1

zugeordnete T-Lymphozyten (Prinz, 2004). $\text{INF-}\gamma$ zeigte in Versuchen mit einschichtigen Epithelzellen eine Umverteilung von Claudin-1 von den Zell-Zell-Grenzen in das Zytoplasma (Bruewer et al., 2003). Dies könnte die fehlende Expression von Claudin-1 in unmittelbarer Umgebung der T-Lymphozyten erklären. Interessanterweise wurde allerdings sowohl für IL-17 als auch für IL-22, die beide ebenfalls in der Psoriasis eine wichtige Rolle spielen, in intestinalen Zellen eine hochregulierende Wirkung auf Claudin-1 beschrieben (Mizuno et al., 2014, Kinugasa et al., 2000). Leider war es nicht möglich, in dieser Arbeit die Färbung für IL-17 und IL-22 zu etablieren, um der Fragestellung, ob die CD4-positiven Zellen, die zur Herabregulation von Claudin-1 führen, IL-17- oder IL-22-positiv sind, nachzugehen.

In der Färbung mit Claudin-1-Antikörpern verhalten sich die FoxP3^+ -Zellen analog den CD4^+ -Zellen. Auch hier zeigen manche FoxP3^+ -Zellen eine Koexpression mit Claudin-1. Auffallend ist, dass es nur in der Umgebung Cldn-1 FoxP3^+ -Zellen zu einer Herabregulation von Claudin-1 und einer hinter den Immunzellen liegenden „Straße“ fehlender Expression kommt. Die $\text{Cldn-1}^+\text{FoxP3}^+$ -Zellen weisen hingegen keine Unterbrechung des Claudin-1-Netzwerkes der Keratinozyten auf.

Auch hier stellt sich die Frage nach dem Effekt der Herabregulation von Claudin-1 in den Keratinozyten. Wie für ZO1 konnte auch für Claudin-1 gezeigt werden, dass es für die Barrierefunktion von Ionen sowie kleinen und großen Molekülen wichtig ist (Kirschner et al., 2013). Somit könnte auch hier die Herabregulation eine Öffnung des interzellulären Weges für die jeweilige Immunzelle widerspiegeln.

5.2.3 Interaktion der T-Lymphozyten mit Occludin

Ebenso wie ZO1 findet man Occludin nicht in den CD4-positiven Zellen. Darüber hinaus gibt es keine Korrelation des Expressionsmusters von Occludin mit der Menge oder Eindringtiefe von CD4-positiven Zellen. Im direkten Kontakt wird Occludin distal der CD4-positiven Zellen herabreguliert, sodass eine Kerbe im Occludinnetz entsteht. Allerdings sind die CD4^+ -Zellen immer nur am proximalen Rand des Occludinnetzwerkes zu finden. Dies könnte darauf hin deuten, dass die CD4^+ -Zellen nicht so leicht durch das Occludinnetz migrieren können.

Der direkte Kontakt zwischen FoxP3-Zelle und Occludin führte nicht zu einer veränderten Expression. Da allerdings nur ein einziger dieser Kontakte beobachtet wurde, kann daraus keine Schlussfolgerung gezogen werden.

Die Undurchdringbarkeit des Occludin-Netzwerkes durch die T-Lymphozyten weist darauf hin, dass Occludin das restriktivste der Tight Junction-Proteine ist und die bedeutendste Barriere für die Immunzellen nach außen darstellt. Wie bereits erwähnt konnten Alexander et al. zeigen, dass T-Lymphozyten existieren, die auf ihrer Oberfläche Occludin exprimieren und dass sie dies dazu nutzen, durch Endothelien zu wandern (Alexander et al., 1998, Edelblum et al., 2012). Die fehlende Occludin-Expression der hier untersuchten T-Lymphozyten könnte dafür verantwortlich sein, dass die Immunzellen nicht fähig sind, durch das Occludinnetzwerk zu migrieren und somit nicht an die Hautoberfläche weiter wandern.

5.3 Lokalisation und Expressionsmuster von CAR

Die Psoriasis ist durch den massiven Einstrom von Immunzellen in Dermis und Epidermis gekennzeichnet. Um diesen Einstrom in Zukunft therapeutisch modulieren zu können, sind Kenntnisse der Migrationswege von Bedeutung. Die Suche nach Adhäsionsmolekülen, die die transepitheliale Migration regulieren, könnte neue Zielstrukturen für die Therapie entzündlicher Erkrankungen liefern (Zen et al., 2005).

Einer dieser Wege, für den die Migration von $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen ist, führt über den Cocksackie-and-Adenovirus-Rezeptor. Dieser Rezeptor ist ein Protein der Immunglobulin-Superfamily (Tomko et al., 1997) und Bestandteil der Tight Junctions (Cohen et al., 2001). Er wird von $\gamma\delta$ -T-Zellen als costimulatorisches Signal zur Migration durch Epithelien benutzt. Hierzu bindet der auf $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimierte Ligand JAML an CAR (Zen et al., 2005).

Neben der CAR-JAML-Bindung konnte für $\gamma\delta$ -T-Zellen auch eine weitere Möglichkeit der Diapedese über Occludin nachgewiesen werden (Edelblum et al., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Lokalisation von CAR in humaner gesunder und psoriatischer Haut beschrieben. Der Cocksackie-and-Adenovirus-Rezeptor wird in gesunder humaner Haut durchgehend im Stratum basale und in einigen Proben auch im Stratum spinosum als membranständige Färbung beobachtet, nur selten finden sich abgrenzbare Stellen zytoplasmatischer Färbungen. Die Lage im unteren Teil der

Epidermis spricht dafür, dass CAR nicht in Tight Junctions lokalisiert ist, da diese nur im Stratum granulosum vorhanden sind (Kirschner, 2010), sondern in anderen Strukturen oder frei in der Plasmamembran. In Haut, die Sonnenexposition ausgesetzt war, ist die CAR-Expression weniger stark ausgeprägt. Es scheint in gesunder Haut keine Beeinflussung der CAR-Expression durch die An- oder Abwesenheit JAML-positiver Zellen zu geben.

In psoriatischer Haut verändert sich die CAR-Färbung vollständig. CAR ist nun nicht mehr in der Zellmembran, sondern überwiegend intrazellulär lokalisiert. Die Färbung ist zudem häufig unterbrochen. Diese fleckenhafte Färbung verstärkt sich noch, wenn viele JAML-positive Zellen vorhanden sind, was zeigt, dass die Anwesenheit JAML-positiver Zellen die intrazelluläre Lokalisation von CAR fördert. Dies ist überraschend, würde man doch erwarten, dass umso mehr CAR zellmembranständig lokalisiert ist, umso mehr JAML-positive Zellen als Interaktionspartner zur Verfügung stehen. Eine Erklärung könnte darin liegen, dass die Keratinozyten sich durch den Rückzug von CAR in die Zelle vor der Aktivierung durch die JAML-positiven Zellen schützen.

Im Laufe dieser Arbeit wurde eine Untersuchung von CAR in muriner Haut und seiner Veränderung bei Hitzestress veröffentlicht (Deng et al., 2013). Die von den Autoren beschriebene „mild positive staining“ in den Keratinozyten der gesunden murinen Haut spezifiziert leider nicht, in welcher Schicht die Färbung vorhanden war und ob in der Membran oder intrazellulär. Die in der Publikation vorhandenen Bilder waren leider nicht aussagekräftig.

Generell sollte aber die CAR-Färbung mit einem zweiten Antikörper, der nach Möglichkeit ein anderes Epitop erkennt, verifiziert werden, um Färbeartefakte auszuschließen. Parallel durchgeführte Isotypkontrollen zeigten ein eindeutig negatives Ergebnis, was zumindest einen Färbeartefakt unwahrscheinlich macht.

Die Lokalisation und Verteilung des Cocksackie-and-Adenovirus-Receptors ist von großer Bedeutung auch für therapeutische Ansätze. Adenoviren sind als Vektor im Gentransfer und in der Gentherapie weithin im Einsatz (Philipson and Pettersson, 2004). Der Rezeptor kann aber nur dann als therapeutisches Ziel genutzt werden, wenn sein Vorkommen im pathologischen Gewebe bekannt ist. Die meisten Studien zur Gentransfektion durch Adenoviren stammen aus der onkologischen Forschung. Hier

ergibt sich das Problem, dass viele Typen maligner Zellen nur einen niedrigen Level an CAR exprimieren und allein schon aus diesem Grund resistent gegenüber der Infektion durch Adenoviren sind (Rein et al., 2004, Cripe et al., 2001, Miller et al., 1998, Hemmi et al., 1998). Interessant wäre zu untersuchen, ob CAR auch hier womöglich als Folge einer Immunreaktion gegen die maligne Zelle Rückzugsmechanismen in das Zytoplasma nutzt und deshalb nicht mehr membranständig zum Gentransfer zur Verfügung steht.

Mehrfach wurde bislang ein Einfluss von CAR auf die Zellproliferation bzw. Apoptose beschrieben. Allerdings verhält sich CAR in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich. So führt bei Blasenkrebszellen die angestiegene CAR-Expression zur Heraufregulation von p21 und in der Folge zur Anhäufung des Retinoblastom-Proteins, was letztendlich zur Apoptose der Zelle führt (Okegawa et al., 2001). In Brustkrebszellen ist die CAR-Expression aufgrund eines Östrogeneffekts heraufreguliert, was zur Proliferation der Krebszellen führt (Vindrieux et al., 2011). Auch in murinen Verbrennungswunden steigt die CAR-Expression als Antwort auf Verletzungsfaktoren (Deng et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass die membranständige Expression von CAR zu Gunsten einer intrazellulären Expression zurückgeht. Da die Psoriasis einhergeht mit einer vermehrten Proliferation der Keratinozyten, würde dies die Hypothese von intrazellulärem CAR als wachstumsfördernden Faktor stützen. Dies würde zu den Schlussfolgerungen von Deng et al. passen, die ein erhöhtes Level von CAR in Verbrennungswunden als proliferationsfördernd postuliert haben. Es bleibt herauszufinden, welche Faktoren CAR herauf- bzw herabregulieren und inwiefern Immunzellen wie $\gamma\delta$ -T-Zellen einen Einfluss auf diese Regulation haben. Dabei sollte sicherlich ein Augenmerk auf die von den Immunzellen produzierten Zytokine geworfen werden, da für diese bereits modulierende Einflüsse auf TJ-Proteine vorbeschrieben sind (Bruewer et al., 2003).

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem veränderten Expressionsmuster der Tight Junction-Proteine ZO1, Claudin-1 und Occludin in der Früh- und Spätform der Psoriasis und dem Zusammenhang zwischen diesen Veränderungen und CD4⁺-, FoxP3⁺- und CD8⁺- T-Zellen. Dabei konnten verschiedene Interaktionen zwischen den Immunzellen und den umgebenden Tight Junction-Proteinen beobachtet werden. Darüber hinaus wurde die Lokalisation eines weiteren möglichen TJ-Proteins, des Coxsackie-and-Adenovirus-Receptors (CAR) in humaner gesunder Haut und in Psoriasis charakterisiert und in Zusammenhang mit Immunzellen, die den Interaktionspartner JAML tragen, gestellt.

Generell konnte ich zeigen, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Grad der Verbreiterung der Expression von ZO1 und dem Vorliegen der Früh- und Spätform der Psoriasis gab. Bezüglich Claudin-1 zeigte sich eine Tendenz der häufigeren Herabregulation in unteren Schichten des Stratum spinosum in der Spätform verglichen zur Frühform, dies war aber nicht signifikant. Dasselbe gilt für die verbreiterte Expression von Occludin, die tendenziell breiter in der Spät- als in der Frühform beobachtet wurde.

Bezüglich der Interaktion von T-Lymphozyten mit ZO1 zeigte sich, dass bei etwa zwei Drittel aller CD4⁺-Zellen in direktem Kontakt mit ZO1-positiven Keratinocyten eine Herabregulation von ZO1 in den Keratinocyten beobachtet werden kann. Zu diesen herabregulierenden CD4⁺-Zellen gehören die FoxP3⁺-Zellen, deren Anwesenheit grundsätzlich mit einer Herabregulation assoziiert ist. Des Weiteren korreliert eine verbreiterte ZO1-Expression in der Epidermis mit einer größeren Eindringtiefe sowohl der CD4-positiven als auch der FoxP3-positiven Zellen in höhergelegene epidermale Schichten. Die CD8⁺-Zellen zeigten keine Korrelation zur Expression von ZO1.

Für Claudin-1 konnte ich keine Korrelation zwischen der Expression in den verschiedenen epidermalen Schichten und der Eindringtiefe von CD4⁺- bzw. FoxP3⁺-Zellen beobachten. Interessanterweise gibt es aber sowohl CD4⁺- als auch FoxP3⁺-Zellen, die Claudin-1 exprimieren. Diese koexprimierenden Zellen werden zwischen den Claudin-1 exprimierenden Keratinozyten gefunden, ohne Unterbrechung des

Claudin-1-Netzwerkes. Allerdings beobachtet man manchmal zwischen dem Stratum basale und der Lokalisation der CD4⁺- bzw. FoxP3⁺-Zelle auf ihrem Weg durch das Epithel eine Herabregulation der Claudin-1-Färbung. Letzteres gilt auch für einige CD4⁺-Zellen, die negativ für Claudin-1 sind. Diese Zellen zeigen auch häufig eine Herabregulation von Claudin-1 in ihrer unmittelbaren Umgebung. Für FoxP3⁺-Zellen, die Claudin-1-negativ sind, beobachtet man für alle Zellen in ihrer Umgebung und auf ihrem Migrationsweg eine Claudin-1-Herabregulation.

Auch für Occludin konnte ich keine Korrelation zwischen der Eindringtiefe der CD4-positiven bzw. FoxP3⁺-positiven Zellen und der Expressionsbreite beobachten. In den wenigen Kontakten von T-Lymphozyten mit Occludin zeigte sich Occludin herabreguliert. Es wurde nur eine FoxP3⁺-Zelle in Kontakt mit Occludin-positiven Zellen gefunden, diese führte nicht zur Herabregulation. Auffallend ist, dass die untersuchten Immunzellen sich ausschließlich proximal des Occludin-Netzwerkes finden. Occludin scheint also eine wichtige Barrierefunktion gegenüber den T-Lymphozyten zu haben.

Der Coxsackie-and-Adenovirus-Receptor wird in gesunder Haut durchgehend im Stratum basale und teilweise im Stratum spinosum als membranständige Färbung beobachtet, nur selten findet sich zusätzlich eine intrazelluläre Färbung. Dies zeigt, dass dieses Protein in der Epidermis nicht in Tight Junctions, die ausschließlich im Stratum granulosum vorhanden sind, lokalisiert ist, sondern in anderen Strukturen oder frei in der Membran vorliegt. In Haut, die Sonnenexposition ausgesetzt war, ist die CAR-Expression weniger stark ausgeprägt. Es scheint in gesunder Haut keine Beeinflussung der CAR-Expression durch JAML-positive Zellen zu geben. In psoriatischer Haut ist die CAR-Färbung vor allem intrazellulär, zum Teil auch lückenhaft. Die Anwesenheit JAML-positiver Zellen erhöht die intrazelluläre Lokalisation.

7 Literaturverzeichnis

- AIJAZ, S., BALDA, M. S. & MATTER, K. 2006. Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol*, 248, 261-98.
- ALEXANDER, J. S., DAYTON, T., DAVIS, C., HILL, S., JACKSON, T. H., BLASCHUK, O., SYMONDS, M., OKAYAMA, N., KEVIL, C. G., LAROUX, F. S., BERNEY, S. M. & KIMPEL, D. 1998. Activated T-lymphocytes express occludin, a component of tight junctions. *Inflammation*, 22, 573-82.
- ANDERSON, J. M. 2001. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci*, 16, 126-30.
- ANDERSON, J. M. & VAN ITALLIE, C. M. 1995. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol*, 269, G467-75.
- ANDERSON, J. M., VAN ITALLIE, C. M. & FANNING, A. S. 2004. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 140-5.
- ANDO-AKATSUKA, Y., SAITOU, M., HIRASE, T., KISHI, M., SAKAKIBARA, A., ITOH, M., YONEMURA, S., FURUSE, M. & TSUKITA, S. 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol*, 133, 43-7.
- AUGUSTIN, M., CHAPNIK, J., GUPTA, S., BUESCH, K. & RADTKE, M. 2011. Psoriasis verursacht hohe Kosten, mindert die Produktivität am Arbeitsplatz und verringert die Lebensqualität. *Aktuelle Dermatologie*, 37, 353-359.
- AUSTIN, L. M., OZAWA, M., KIKUCHI, T., WALTERS, I. B. & KRUEGER, J. G. 1999. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol*, 113, 752-9.
- BAKER, B. S., SWAIN, A. F., FRY, L. & VALDIMARSSON, H. 1984. Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis. *Br J Dermatol*, 110, 555-64.
- BALDA, M. S., GARRETT, M. D. & MATTER, K. 2003. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol*, 160, 423-32.

- BATA-CSORGO, Z., HAMMERBERG, C., VOORHEES, J. J. & COOPER, K. D. 1995. Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. Cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes. *J Clin Invest*, 95, 317-27.
- BERGELSON, J. M., CUNNINGHAM, J. A., DROGUETT, G., KURT-JONES, E. A., KRITHIVAS, A., HONG, J. S., HORWITZ, M. S., CROWELL, R. L. & FINBERG, R. W. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275, 1320-3.
- BEWLEY, M. C., SPRINGER, K., ZHANG, Y. B., FREIMUTH, P. & FLANAGAN, J. M. 1999. Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science*, 286, 1579-83.
- BJERKE, J. R., KROGH, H. K. & MATRE, R. 1978. Characterization of mononuclear cell infiltrates in psoriatic lesions. *J Invest Dermatol*, 71, 340-3.
- BOS, J. D., ZONNEVELD, I., DAS, P. K., KRIEG, S. R., VAN DER LOOS, C. M. & KAPSENBERG, M. L. 1987. The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol*, 88, 569-73.
- BOVENSCHEN, H. J., SEYGER, M. M. & VAN DE KERKHOF, P. C. 2005. Plaque psoriasis vs. atopic dermatitis and lichen planus: a comparison for lesional T-cell subsets, epidermal proliferation and differentiation. *Br J Dermatol*, 153, 72-8.
- BOVENSCHEN, H. J., VAN DE KERKHOF, P. C., VAN ERP, P. E., WOESTENENK, R., JOOSTEN, I. & KOENEN, H. J. 2011. Foxp3⁺ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J Invest Dermatol*, 131, 1853-60.
- BRANDNER, J. M. 2009. Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur J Pharm Biopharm*, 72, 289-94.
- BRANDNER, J. M., KIEF, S., GRUND, C., RENDL, M., HOUDEK, P., KUHN, C., TSCHACHLER, E., FRANKE, W. W. & MOLL, I. 2002. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol*, 81, 253-63.
- BRANDNER, J. M., KIEF, S., WLADYKOWSKI, E., HOUDEK, P. & MOLL, I. 2006. Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol Physiol*, 19, 71-7.

- BRUEWER, M., LUEGERING, A., KUCHARZIK, T., PARKOS, C. A., MADARA, J. L., HOPKINS, A. M. & NUSRAT, A. 2003. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*, 171, 6164-72.
- CARGILL, M., SCHRODI, S. J., CHANG, M., GARCIA, V. E., BRANDON, R., CALLIS, K. P., MATSUNAMI, N., ARDLIE, K. G., CIVELLO, D., CATANESE, J. J., LEONG, D. U., PANKO, J. M., MCALLISTER, L. B., HANSEN, C. B., PAPENFUSS, J., PRESCOTT, S. M., WHITE, T. J., LEPPERT, M. F., KRUEGER, G. G. & BEGOVICH, A. B. 2007. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet*, 80, 273-90.
- CHAN, J. R., BLUMENSCHNEIN, W., MURPHY, E., DIVEU, C., WIEKOWSKI, M., ABBONDANZO, S., LUCIAN, L., GEISLER, R., BRODIE, S., KIMBALL, A. B., GORMAN, D. M., SMITH, K., DE WAAL MALEFYT, R., KASTELEIN, R. A., MCCLANAHAN, T. K. & BOWMAN, E. P. 2006. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med*, 203, 2577-87.
- CHAVAKIS, T., KEIPER, T., MATZ-WESTPHAL, R., HERSEMAYER, K., SACHS, U. J., NAWROTH, P. P., PREISSNER, K. T. & SANTOSO, S. 2004. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 279, 55602-8.
- CHAVAKIS, T., PREISSNER, K. T. & SANTOSO, S. 2003. Leukocyte trans-endothelial migration: JAMs add new pieces to the puzzle. *Thromb Haemost*, 89, 13-7.
- CHEN, J. W., GHOSH, R., FINBERG, R. W. & BERGELSON, J. M. 2003. Structure and chromosomal localization of the murine coxsackievirus and adenovirus receptor gene. *DNA Cell Biol*, 22, 253-9.
- CHEN, L., SHEN, Z., WANG, G., FAN, P. & LIU, Y. 2008. Dynamic frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci*, 51, 200-3.
- CHRISTOPHERS, E. 2001. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol*, 26, 314-20.

- CHUNG, Y., YANG, X., CHANG, S. H., MA, L., TIAN, Q. & DONG, C. 2006. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4⁺ T lymphocytes. *Cell Res*, 16, 902-7.
- COFFEY, R. J., JR., DERYNCK, R., WILCOX, J. N., BRINGMAN, T. S., GOUSTIN, A. S., MOSES, H. L. & PITTELKOW, M. R. 1987. Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Nature*, 328, 817-20.
- COHEN, C. J., SHIEH, J. T., PICKLES, R. J., OKEGAWA, T., HSIEH, J. T. & BERGELSON, J. M. 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 15191-6.
- COLEGIO, O. R., VAN ITALLIE, C., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2003. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C1346-54.
- COOPER, K. D., HAMMERBERG, C., BAADSGAARD, O., ELDER, J. T., CHAN, L. S., TAYLOR, R. S., VOORHEES, J. J. & FISHER, G. 1990. Interleukin-1 in human skin: dysregulation in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 95, 24S-26S.
- CRIFE, T. P., DUNPHY, E. J., HOLUB, A. D., SAINI, A., VASI, N. H., MAHLER, Y. Y., COLLINS, M. H., SNYDER, J. D., KRASNYKH, V., CUIEL, D. T., WICKHAM, T. J., DEGREGORI, J., BERGELSON, J. M. & CURRIER, M. A. 2001. Fiber knob modifications overcome low, heterogeneous expression of the coxsackievirus-adenovirus receptor that limits adenovirus gene transfer and oncolysis for human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res*, 61, 2953-60.
- DE CID, R., RIVEIRA-MUNOZ, E., ZEEUWEN, P. L., ROBARGE, J., LIAO, W., DANNHAUSER, E. N., GIARDINA, E., STUART, P. E., NAIR, R., HELMS, C., ESCARAMIS, G., BALLANA, E., MARTIN-EZQUERRA, G., DEN HEIJER, M., KAMSTEEG, M., JOOSTEN, I., EICHLER, E. E., LAZARO, C., PUJOL, R. M., ARMENGOL, L., ABECASIS, G., ELDER, J. T., NOVELLI, G., ARMOUR, J. A., KWOK, P. Y., BOWCOCK, A., SCHALKWIJK, J. & ESTIVILL, X. 2009. Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat Genet*, 41, 211-5.

- DENG, X., JIA, C., CHEN, F., LIU, J. & ZHOU, Z. 2013. Effects of heat stress on the expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in mouse skin keratinocytes. *Exp Ther Med*, 6, 1029-1033.
- DRAGSTEN, P. R., BLUMENTHAL, R. & HANDLER, J. S. 1981. Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature*, 294, 718-22.
- EDELBLUM, K. L., SHEN, L., WEBER, C. R., MARCHIANDO, A. M., CLAY, B. S., WANG, Y., PRINZ, I., MALISSEN, B., SPERLING, A. I. & TURNER, J. R. 2012. Dynamic migration of gammadelta intraepithelial lymphocytes requires occludin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 7097-102.
- ETTEHADI, P., GREAVES, M. W., WALLACH, D., ADERKA, D. & CAMP, R. D. 1994. Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol*, 96, 146-51.
- FANNING, A. S., JAMESON, B. J., JESAITIS, L. A. & ANDERSON, J. M. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 273, 29745-53.
- FUJIMOTO, K. 1995. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci*, 108 (Pt 11), 3443-9.
- FUJIMURA, T., OKUYAMA, R., ITO, Y. & AIBA, S. 2008. Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. *Br J Dermatol*, 158, 1256-63.
- FURUSE, M., FUJITA, K., HIIRAGI, T., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1998a. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141, 1539-50.
- FURUSE, M., HATA, M., FURUSE, K., YOSHIDA, Y., HARATAKE, A., SUGITANI, Y., NODA, T., KUBO, A. & TSUKITA, S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 156, 1099-111.
- FURUSE, M., HIRASE, T., ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S. & TSUKITA, S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123, 1777-88.

- FURUSE, M., ITOH, M., HIRASE, T., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S. & TSUKITA, S. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*, 127, 1617-26.
- FURUSE, M., SASAKI, H., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1998b. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*, 143, 391-401.
- FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol*, 16, 181-8.
- GHORESCHI, K., WEIGERT, C. & ROCKEN, M. 2007. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis. *Clin Dermatol*, 25, 574-80.
- GOODMAN, W. A., LEVINE, A. D., MASSARI, J. V., SUGIYAMA, H., MCCORMICK, T. S. & COOPER, K. D. 2009. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol*, 183, 3170-6.
- GRAPHPAD SOFTWARE, I. 2005. *GraphPad Software - Analyze, graph and organize your data* [Online]. Available: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>.
- GROSSMAN, R. M., KRUEGER, J., YOURISH, D., GRANELLI-PIPERNO, A., MURPHY, D. P., MAY, L. T., KUPPER, T. S., SEHGAL, P. B. & GOTTLIEB, A. B. 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6367-71.
- GUDJONSSON, J. E., KARASON, A., ANTONSDOTTIR, A., RUNARSDOTTIR, E. H., HAUKSSON, V. B., UPMANYU, R., GULCHER, J., STEFANSSON, K. & VALDIMARSSON, H. 2003. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol*, 148, 233-5.
- GUO, Y. L., BAI, R., CHEN, C. X., LIU, D. Q., LIU, Y., ZHANG, C. Y. & ZEN, K. 2009. Role of junctional adhesion molecule-like protein in mediating monocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 75-83.
- GUTOWSKA-OWSIK, D., SCHAUPP, A. L., SALIMI, M., SELVAKUMAR, T. A., MCPHERSON, T., TAYLOR, S. & OGG, G. S. 2012. IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp Dermatol*, 21, 104-10.

- HACKEL, D., KRUG, S. M., SAUER, R. S., MOUSA, S. A., BOCKER, A., PFLUCKE, D., WREDE, E. J., KISTNER, K., HOFFMANN, T., NIEDERMIRTL, B., SOMMER, C., BLOCH, L., HUBER, O., BLASIG, I. E., AMASHEH, S., REEH, P. W., FROMM, M., BRACK, A. & RITTNER, H. L. 2012. Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E2018-27.
- HADJ-RABIA, S., BAALA, L., VABRES, P., HAMEL-TEILLAC, D., JACQUEMIN, E., FABRE, M., LYONNET, S., DE PROST, Y., MUNNICH, A., HADCHOUEL, M. & SMAHI, A. 2004. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*, 127, 1386-90.
- HANCOCK, G. E., KAPLAN, G. & COHN, Z. A. 1988. Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells. *J Exp Med*, 168, 1395-402.
- HASKINS, J., GU, L., WITTCHEN, E. S., HIBBARD, J. & STEVENSON, B. R. 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 141, 199-208.
- HELFRICH, I., SCHMITZ, A., ZIGRINO, P., MICHELS, C., HAASE, I., LE BIVIC, A., LEITGES, M. & NIESSEN, C. M. 2007. Role of aPKC isoforms and their binding partners Par3 and Par6 in epidermal barrier formation. *J Invest Dermatol*, 127, 782-91.
- HEMMI, S., GEERTSEN, R., MEZZACASA, A., PETER, I. & DUMMER, R. 1998. The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther*, 9, 2363-73.
- HENSELER, T. & CHRISTOPHERS, E. 1985. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 13, 450-6.
- HIRASE, T., STADDON, J. M., SAITOU, M., ANDO-AKATSUKA, Y., ITOH, M., FURUSE, M., FUJIMOTO, K., TSUKITA, S. & RUBIN, L. L. 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci*, 110 (Pt 14), 1603-13.
- HUBER, D., BALDA, M. S. & MATTER, K. 2000. Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils. *J Biol Chem*, 275, 5773-8.

- HURD, T. W., GAO, L., ROH, M. H., MACARA, I. G. & MARGOLIS, B. 2003. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol*, 5, 137-42.
- IMAMURA, Y., ITOH, M., MAENO, Y., TSUKITA, S. & NAGAFUCHI, A. 1999. Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol*, 144, 1311-22.
- INAI, T., KOBAYASHI, J. & SHIBATA, Y. 1999. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol*, 78, 849-55.
- ITOH, M., MORITA, K. & TSUKITA, S. 1999. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem*, 274, 5981-6.
- ITOH, M., NAGAFUCHI, A., MOROI, S. & TSUKITA, S. 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*, 138, 181-92.
- ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S., KITANI-YASUDA, T. & TSUKITA, S. 1993. The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 121, 491-502.
- KEMPF, W., HANTSCHKE, M., KUTZNER, H. & BURGDORF, W. H. C. 2011. *Dermatopathologie*, Berlin, heidelberg, Springer-Verlag
- KINUGASA, T., SAKAGUCHI, T., GU, X. & REINECKER, H. C. 2000. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology*, 118, 1001-11.
- KIRSCHNER, N. 2010. *Untersuchung der Expression, Lokalisation und Funktionalität von Tight Junctions in murinen und humanen Modellsystemen mit Barrieredefekten in der Haut*. Dissertation, Universität Hamburg.
- KIRSCHNER, N. & BRANDNER, J. M. 2012. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci*, 1257, 158-66.
- KIRSCHNER, N., HOUDEK, P., FROMM, M., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2010. Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol*, 89, 839-42.
- KIRSCHNER, N., POETZL, C., VON DEN DRIESCH, P., WLADYKOWSKI, E., MOLL, I., BEHNE, M. J. & BRANDNER, J. M. 2009. Alteration of tight

- junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol*, 175, 1095-106.
- KIRSCHNER, N., ROSENTHAL, R., FURUSE, M., MOLL, I., FROMM, M. & BRANDNER, J. M. 2013. Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 133, 1161-9.
- KIRSCHNER, N., ROSENTHAL, R., GUNZEL, D., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2012. Tight junctions and differentiation--a chicken or the egg question? *Exp Dermatol*, 21, 171-5.
- KUBO, A., NAGAO, K., YOKOUCHI, M., SASAKI, H. & AMAGAI, M. 2009. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*, 206, 2937-46.
- KUCHARZIK, T., WALSH, S. V., CHEN, J., PARKOS, C. A. & NUSRAT, A. 2001. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol*, 159, 2001-9.
- KUNZ, S., WOLK, K., WITTE, E., WITTE, K., DOECKE, W. D., VOLK, H. D., STERRY, W., ASADULLAH, K. & SABAT, R. 2006. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp Dermatol*, 15, 991-1004.
- LANG, G. 2006. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, Vienna, Springer-Verlag/Wien.
- LEMMERS, C., MICHEL, D., LANE-GUERMONPREZ, L., DELGROSSI, M. H., MEDINA, E., ARSANTO, J. P. & LE BIVIC, A. 2004. CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 15, 1324-33.
- LIANG, S. C., TAN, X. Y., LUXENBERG, D. P., KARIM, R., DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K., COLLINS, M. & FOUSER, L. A. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*, 203, 2271-9.
- LOWES, M. A., CHAMIAN, F., ABELLO, M. V., FUENTES-DUCULAN, J., LIN, S. L., NUSSBAUM, R., NOVITSKAYA, I., CARBONARO, H., CARDINALE, I., KIKUCHI, T., GILLEAUDEAU, P., SULLIVAN-WHALEN, M.,

- WITTKOWSKI, K. M., PAPP, K., GAROVOY, M., DUMMER, W., STEINMAN, R. M. & KRUEGER, J. G. 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, 19057-62.
- LUISSINT, A. C., LUTZ, P. G., CALDERWOOD, D. A., COURAUD, P. O. & BOURDOULOUS, S. 2008. JAM-L-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is regulated in cis by alpha4beta1 integrin activation. *J Cell Biol*, 183, 1159-73.
- MATTER, K., AIJAZ, S., TSAPARA, A. & BALDA, M. S. 2005. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 453-8.
- MATTER, K. & BALDA, M. S. 1999. Occludin and the functions of tight junctions. *Int Rev Cytol*, 186, 117-46.
- MCCARTHY, K. M., SKARE, I. B., STANKEWICH, M. C., FURUSE, M., TSUKITA, S., ROGERS, R. A., LYNCH, R. D. & SCHNEEBERGER, E. E. 1996. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci*, 109 (Pt 9), 2287-98.
- MILLER, C. R., BUCHSBAUM, D. J., REYNOLDS, P. N., DOUGLAS, J. T., GILLESPIE, G. Y., MAYO, M. S., RABEN, D. & CURIEL, D. T. 1998. Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res*, 58, 5738-48.
- MITCHELL, J. C. 1967. Proportionate distribution of skin diseases in a dermatological practice: enumeration by standard nomenclature of 12,578 cases from clinic and private practice. *Can Med Assoc J*, 97, 1346-50.
- MIZUNO, S., MIKAMI, Y., KAMADA, N., HANDA, T., HAYASHI, A., SATO, T., MATSUOKA, K., MATANO, M., OHTA, Y., SUGITA, A., KOGANEI, K., SAHARA, R., TAKAZOE, M., HISAMATSU, T. & KANAI, T. 2014. Cross-talk Between RORgamma⁺ Innate Lymphoid Cells and Intestinal Macrophages Induces Mucosal IL-22 Production in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 20, 1426-34.
- MOLL, I. 2010. *Dermatologie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.

- MOOG-LUTZ, C., CAVE-RIANT, F., GUIBAL, F. C., BREAU, M. A., DI GIOIA, Y., COURAUD, P. O., CAYRE, Y. E., BOURDOULOUS, S. & LUTZ, P. G. 2003. JAML, a novel protein with characteristics of a junctional adhesion molecule, is induced during differentiation of myeloid leukemia cells. *Blood*, 102, 3371-8.
- MOROI, S., SAITOU, M., FUJIMOTO, K., SAKAKIBARA, A., FURUSE, M., YOSHIDA, O. & TSUKITA, S. 1998. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol*, 274, C1708-17.
- NAIR, R. P., DUFFIN, K. C., HELMS, C., DING, J., STUART, P. E., GOLDFAR, D., GUDJONSSON, J. E., LI, Y., TEJASVI, T., FENG, B. J., RUETHER, A., SCHREIBER, S., WEICHENTHAL, M., GLADMAN, D., RAHMAN, P., SCHRODI, S. J., PRAHALAD, S., GUTHERY, S. L., FISCHER, J., LIAO, W., KWOK, P. Y., MENTER, A., LATHROP, G. M., WISE, C. A., BEGOVICH, A. B., VOORHEES, J. J., ELDER, J. T., KRUEGER, G. G., BOWCOCK, A. M. & ABECASIS, G. R. 2009. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet*, 41, 199-204.
- NAIR, R. P., RUETHER, A., STUART, P. E., JENISCH, S., TEJASVI, T., HIREMAGALORE, R., SCHREIBER, S., KABELITZ, D., LIM, H. W., VOORHEES, J. J., CHRISTOPHERS, E., ELDER, J. T. & WEICHENTHAL, M. 2008. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *J Invest Dermatol*, 128, 1653-61.
- NESTLE, F. O., DI MEGLIO, P., QIN, J. Z. & NICKOLOFF, B. J. 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9, 679-91.
- NIESSEN, C. M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127, 2525-32.
- NIESSEN, M. T., IDEN, S. & NIESSEN, C. M. 2012. The in vivo function of mammalian cell and tissue polarity regulators--how to shape and maintain the epidermal barrier. *J Cell Sci*, 125, 3501-10.
- NITTA, T., HATA, M., GOTOH, S., SEO, Y., SASAKI, H., HASHIMOTO, N., FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 161, 653-60.
- NOGRALES, K. E., DAVIDOVICI, B. & KRUEGER, J. G. 2010. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg*, 29, 3-9.

- NOLL, S. & SCHAUB-KUHNEN, S. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*, München, Urban & Fischer.
- OKEGAWA, T., PONG, R. C., LI, Y., BERGELSON, J. M., SAGALOWSKY, A. I. & HSIEH, J. T. 2001. The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res*, 61, 6592-600.
- ONUMA, S. 1994. Immunohistochemical studies of infiltrating cells in early and chronic lesions of psoriasis. *J Dermatol*, 21, 223-32.
- PARIS, L., TONUTTI, L., VANNINI, C. & BAZZONI, G. 2008. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 646-59.
- PASARE, C. & MEDZHITOV, R. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 299, 1033-6.
- PELTONEN, S., RIEHOKAINEN, J., PUMMI, K. & PELTONEN, J. 2007. Tight junction components occludin, ZO-1, and claudin-1, -4 and -5 in active and healing psoriasis. *Br J Dermatol*, 156, 466-72.
- PHILIPSON, L. & PETTERSSON, R. F. 2004. The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Curr Top Microbiol Immunol*, 273, 87-111.
- PÖTZL, C. 2010. *Immunlokalisation von Tight Junction-Proteinen in der Psoriasis*. Universität Hamburg.
- PRINZ, J. C. 2004. [New aspects in the pathogenesis of psoriasis]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2, 448-56; quiz 457.
- PRPIC-MASSARI, L. & KASTELAN, M. 2009. Innate and acquired immunity in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 301, 195-6.
- PUMMI, K., MALMINEN, M., AHO, H., KARVONEN, S. L., PELTONEN, J. & PELTONEN, S. 2001. Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 117, 1050-8.
- QIN, Y., CAPALDO, C., GUMBINER, B. M. & MACARA, I. G. 2005. The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol*, 171, 1061-71.

- QUAGLINO, P., ORTONCELLI, M., COMESSATTI, A., PONTI, R., NOVELLI, M., BERGALLO, M., COSTA, C., CICCHELLI, S., SAVOIA, P. & BERNENGO, M. G. 2009. Circulating CD4+CD25 bright FOXP3+ T cells are up-regulated by biological therapies and correlate with the clinical response in psoriasis patients. *Dermatology*, 219, 250-8.
- RACHOW, S., ZORN-KRUPPA, M., OHNEMUS, U., KIRSCHNER, N., VIDAL-Y-SY, S., VON DEN DRIESCH, P., BORNCHEN, C., EBERLE, J., MILDNER, M., VETTORAZZI, E., ROSENTHAL, R., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2013. Occludin is involved in adhesion, apoptosis, differentiation and Ca²⁺-homeostasis of human keratinocytes: implications for tumorigenesis. *PLoS One*, 8, e55116.
- RASCHPERGER, E., THYBERG, J., PETTERSSON, S., PHILIPSON, L., FUXE, J. & PETTERSSON, R. F. 2006. The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. *Exp Cell Res*, 312, 1566-80.
- REIN, D. T., BREIDENBACH, M., WU, H., HAN, T., HAVIV, Y. S., WANG, M., KIRBY, T. O., KAWAKAMI, Y., DALL, P., ALVAREZ, R. D. & CURIEL, D. T. 2004. Gene transfer to cervical cancer with fiber-modified adenoviruses. *Int J Cancer*, 111, 698-704.
- RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA, G., BONASIO, R., GRANUCCI, F., KRAEHENBUHL, J. P. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2, 361-7.
- ROGALSKI, C., MEYER-HOFFERT, U., PROKSCH, E. & WIEDOW, O. 2002. Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*, 118, 49-54.
- SABAT, R., PHILIPP, S., HOFLICH, C., KREUTZER, S., WALLACE, E., ASADULLAH, K., VOLK, H. D., STERRY, W. & WOLK, K. 2007. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol*, 16, 779-98.
- SAITOU, M., FUJIMOTO, K., DOI, Y., ITOH, M., FUJIMOTO, T., FURUSE, M., TAKANO, H., NODA, T. & TSUKITA, S. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol*, 141, 397-408.

- SAITOU, M., FURUSE, M., SASAKI, H., SCHULZKE, J. D., FROMM, M., TAKANO, H., NODA, T. & TSUKITA, S. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*, 11, 4131-42.
- SAKAGUCHI, T., GU, X., GOLDEN, H. M., SUH, E., RHOADS, D. B. & REINECKER, H. C. 2002. Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J Biol Chem*, 277, 21361-70.
- SAKAKIBARA, A., FURUSE, M., SAITOU, M., ANDO-AKATSUKA, Y. & TSUKITA, S. 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol*, 137, 1393-401.
- SANTOSO, S., SACHS, U. J., KROLL, H., LINDER, M., RUF, A., PREISSNER, K. T. & CHAVAKIS, T. 2002. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med*, 196, 679-91.
- SAWADA, N., MURATA, M., KIKUCHI, K., OSANAI, M., TOBIOKA, H., KOJIMA, T. & CHIBA, H. 2003. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*, 36, 147-56.
- SCHAFFER, I., RUSTENBACH, S. J., RADTKE, M., AUGUSTIN, J., GLAESKE, G. & AUGUSTIN, M. 2011. [Epidemiology of psoriasis in Germany--analysis of secondary health insurance data]. *Gesundheitswesen*, 73, 308-13.
- SCHLAACK, J. F., BUSLAU, M., JOCHUM, W., HERMANN, E., GIRNDT, M., GALLATI, H., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. & FLEISCHER, B. 1994. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol*, 102, 145-9.
- SCHNEEBERGER, E. E. & LYNCH, R. D. 1992. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol*, 262, L647-61.
- SCHNEEBERGER, E. E. & LYNCH, R. D. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286, C1213-28.
- SCHON, M. P. & BOEHNCKE, W. H. 2005. Psoriasis. *N Engl J Med*, 352, 1899-912.

- SCHOTTELIUS, A. J., MOLDAWER, L. L., DINARELLO, C. A., ASADULLAH, K., STERRY, W. & EDWARDS, C. K., 3RD 2004. Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp Dermatol*, 13, 193-222.
- SCHULTZ, G. S., WHITE, M., MITCHELL, R., BROWN, G., LYNCH, J., TWARDZIK, D. R. & TODARO, G. J. 1987. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor. *Science*, 235, 350-2.
- SCHULZKE, J. D., GITTER, A. H., MANKERTZ, J., SPIEGEL, S., SEIDLER, U., AMASHEH, S., SAITOU, M., TSUKITA, S. & FROMM, M. 2005. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*, 1669, 34-42.
- SHAW, A. S. & HUANG, Y. 2010. Immunology. CAR'ing for the skin. *Science*, 329, 1154-5.
- SHIN, K., FOGG, V. C. & MARGOLIS, B. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 207-35.
- SIMPSON, C. L., PATEL, D. M. & GREEN, K. J. 2011. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 565-80.
- STAEHELIN, L. A. 1973. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci*, 13, 763-86.
- STAEHELIN, L. A. 1974. Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol*, 39, 191-283.
- STEVENSON, B. R. & KEON, B. H. 1998. The tight junction: morphology to molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 89-109.
- STEVENSON, B. R., SILICIANO, J. D., MOOSEKER, M. S. & GOODENOUGH, D. A. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 103, 755-66.
- STRATIS, A., PASPARAKIS, M., RUPEC, R. A., MARKUR, D., HARTMANN, K., SCHARFFETTER-KOCHANEK, K., PETERS, T., VAN ROOIJEN, N., KRIEG, T. & HAASE, I. 2006. Pathogenic role for skin macrophages in a mouse model of keratinocyte-induced psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest*, 116, 2094-104.

- SUGAWARA, T., IWAMOTO, N., AKASHI, M., KOJIMA, T., HISATSUNE, J., SUGAI, M. & FURUSE, M. 2013. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J Dermatol Sci*, 70, 12-8.
- SUGIYAMA, H., GYULAI, R., TOICHI, E., GARACZI, E., SHIMADA, S., STEVENS, S. R., MCCORMICK, T. S. & COOPER, K. D. 2005. Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*, 174, 164-73.
- TANIOUS, F. A., VEAL, J. M., BUCZAK, H., RATMEYER, L. S. & WILSON, W. D. 1992. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*, 31, 3103-12.
- TOMKO, R. P., XU, R. & PHILIPSON, L. 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3352-6.
- TOULON, A., BRETON, L., TAYLOR, K. R., TENENHAUS, M., BHAVSAR, D., LANIGAN, C., RUDOLPH, R., JAMESON, J. & HAVRAN, W. L. 2009. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med*, 206, 743-50.
- TSUKITA, S. & FURUSE, M. 1999. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol*, 9, 268-73.
- TSUKITA, S., FURUSE, M. & ITOH, M. 1999. Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 628-33.
- TSUKITA, S., FURUSE, M. & ITOH, M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 285-93.
- TUSCHIL, A., LAM, C., HASLBERGER, A. & LINDLEY, I. 1992. Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. *J Invest Dermatol*, 99, 294-8.
- VALDIMARSSON, H., BAKER, B. S., JONSDOTTIR, I., POWLES, A. & FRY, L. 1995. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today*, 16, 145-9.

- VALYI-NAGY, I., JENSEN, P. J., ALBELDA, S. M. & RODECK, U. 1992. Cytokine-induced expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in neonatal skin explants. *J Invest Dermatol*, 99, 350-6.
- VAN ITALLIE, C., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 107, 1319-27.
- VAN MEER, G. & SIMONS, K. 1986. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J*, 5, 1455-64.
- VERDINO, P. & WILSON, I. A. 2011. JAML and CAR: Two more players in T-cell activation. *Cell Cycle*, 10.
- VERDINO, P., WITHERDEN, D. A., HAVRAN, W. L. & WILSON, I. A. 2010. The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K. *Science*, 329, 1210-4.
- VINCENT, T., PETTERSSON, R. F., CRYSTAL, R. G. & LEOPOLD, P. L. 2004. Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells. *J Virol*, 78, 8047-58.
- VINDRIEUX, D., LE CORRE, L., HSIEH, J. T., METIVIER, R., ESCOBAR, P., CAICEDO, A., BRIGITTE, M. & LAZENNEC, G. 2011. Coxsackie and adenovirus receptor is a target and a mediator of estrogen action in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 18, 311-21.
- VISSERS, W. H., ARNDTZ, C. H., MUYS, L., VAN ERP, P. E., DE JONG, E. M. & VAN DE KERKHOF, P. C. 2004. Memory effector (CD45RO+) and cytotoxic (CD8+) T cells appear early in the margin zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late. *Br J Dermatol*, 150, 852-9.
- VOLLMER, S., MENSSEN, A. & PRINZ, J. C. 2001. Dominant lesional T cell receptor rearrangements persist in relapsing psoriasis but are absent from nonlesional skin: evidence for a stable antigen-specific pathogenic T cell response in psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*, 117, 1296-301.
- WANG, H., PETERS, T., KESS, D., SINDRILARU, A., ORESHKOVA, T., VAN ROOIJEN, N., STRATIS, A., RENKL, A. C., SUNDERKOTTER, C., WLASCHEK, M., HAASE, I. & SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. 2006.

- Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. *J Clin Invest*, 116, 2105-14.
- WATSON, R. E., PODDAR, R., WALKER, J. M., MCGUILL, I., HOARE, L. M., GRIFFITHS, C. E. & O'NEILL C, A. 2007. Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis. *J Pathol*, 212, 450-8.
- WATSON, W., CANN, H. M., FARBER, E. M. & NALL, M. L. 1972. The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol*, 105, 197-207.
- WEINSTEIN, G. D., MCCULLOUGH, J. L. & ROSS, P. A. 1985. Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 85, 579-83.
- WILSON, W. D., TANIOUS, F. A., BARTON, H. J., JONES, R. L., FOX, K., WYDRA, R. L. & STREKOWSKI, L. 1990. DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry*, 29, 8452-61.
- WITHERDEN, D. A., VERDINO, P., RIEDER, S. E., GARIJO, O., MILLS, R. E., TEYTON, L., FISCHER, W. H., WILSON, I. A. & HAVRAN, W. L. 2010. The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial gammadelta T cell activation. *Science*, 329, 1205-10.
- WITTCHEN, E. S., HASKINS, J. & STEVENSON, B. R. 1999. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem*, 274, 35179-85.
- WOLK, K., KUNZ, S., ASADULLAH, K. & SABAT, R. 2002. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol*, 168, 5397-402.
- WOLK, K., KUNZ, S., WITTE, E., FRIEDRICH, M., ASADULLAH, K. & SABAT, R. 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, 21, 241-54.
- WOLK, K., WITTE, E., WALLACE, E., DOCKE, W. D., KUNZ, S., ASADULLAH, K., VOLK, H. D., STERRY, W. & SABAT, R. 2006. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol*, 36, 1309-23.
- YOSHIDA, Y., MORITA, K., MIZOGUCHI, A., IDE, C. & MIYACHI, Y. 2001. Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 293, 239-44.

- ZEN, K., BABBIN, B. A., LIU, Y., WHELAN, J. B., NUSRAT, A. & PARKOS, C. A. 2004. JAM-C is a component of desmosomes and a ligand for CD11b/CD18-mediated neutrophil transepithelial migration. *Mol Biol Cell*, 15, 3926-37.
- ZEN, K., LIU, Y., CAIRO, D. & PARKOS, C. A. 2002. CD11b/CD18-dependent interactions of neutrophils with intestinal epithelium are mediated by fucosylated proteoglycans. *J Immunol*, 169, 5270-8.
- ZEN, K., LIU, Y., MCCALL, I. C., WU, T., LEE, W., BABBIN, B. A., NUSRAT, A. & PARKOS, C. A. 2005. Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie and adenovirus receptor and a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils. *Mol Biol Cell*, 16, 2694-703.
- ZIMMERLI, S. C., KERL, K., HADJ-RABIA, S., HOHL, D. & HAUSER, C. 2008. Human epidermal Langerhans cells express the tight junction protein claudin-1 and are present in human genetic claudin-1 deficiency (NISCH syndrome). *Exp Dermatol*, 17, 20-3.

8 Abkürzungsverzeichnis

CAR	Coxsackie-and-Adenovirus-Receptor
Cldn	Claudin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DETC	Dendritic epidermal T-cells
FoxP3	Forkhead box P3
HLA	Human Leukocyte Antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamily
IL	Interleukin
JAM	Junctional Adhesion Molecule
JAML	Junctional Adhesion Molecule-like
MHC	Major Histocompatibility Complex
ROR γ t	Retinoic acid receptor related orphan receptor γ t
TER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF	Transforming Growth Factor
TJ	Tight Junction
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T _{regs}	Regulatorische T-Lymphozyten
VLA-4	Integrin Very Late-Antigen-4
ZO1	Zonula Occludens-1

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht des Etablierungsversuchs von IL-17 und IL-22.....	44
Tabelle 2. Vorkommen von CAR und JAML-positiven Zellen in gesunder unbelichteter Haut.....	61
Tabelle 3. Vorkommen von CAR und JAML-positiven Zellen in gesunder belichteter Haut.....	62
Tabelle 4. Vorkommen von CAR und JAML-positiven Zellen bei Frühformen der Psoriasis	65
Tabelle 5. Vorkommen von CAR und JAML-positiven Zellen bei Spätformen der Psoriasis	65

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der strukturellen Transmembrananteile der Tight Junctions (Niessen, 2007)	8
Abbildung 2. Modell der durch JAML-CAR regulierten transepithelialen Migration von PMN im intestinalen Zylinderepithel (Zen et al., 2005).....	13
Abbildung 3. Die CAR-JAML-Bindung als costimulatorisches Signal (Shaw and Huang, 2010)	15
Abbildung 4. Zusammenhang zwischen Expression von ZO1 und Stadium der Erkrankung	33
Abbildung 5. Zusammenhang zwischen Eindringtiefe von CD4-positiven Zellen in die Haut und ZO1-Expressionsmuster.....	34
Abbildung 6. Zusammenhang zwischen Eindringtiefe von CD4-positiven Zellen in die Haut und Stadium der Psoriasis	35
Abbildung 7. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 und CD4 in einer Spätform der Psoriasis	36
Abbildung 8. Zusammenhang zwischen ZO1-Expressionsmuster und Eindringtiefe FoxP3-positiver Zellen in die Haut.....	37
Abbildung 9. Zusammenhang zwischen ZO1-Expressionsmuster und Menge an FoxP3-positiven Zellen	38
Abbildung 10. Zusammenhang zwischen Stadium der Erkrankung und Eindringtiefe FoxP3-positiver Zellen in die Haut.....	38
Abbildung 11. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 und FoxP3 in einer Spätform der Psoriasis	39
Abbildung 12. Herabregulierende CD4-positive Zellen versus FoxP3-positive Zellen.	40
Abbildung 13. Zusammenhang zwischen Eindringtiefe CD8-positiver Zellen in die Haut und der verbreiterten Expression von ZO1.....	42
Abbildung 14. Zusammenhang zwischen Eindringtiefe CD8-positiver Zellen in die Haut und dem Stadium der Erkrankung	42

Abbildung 15. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von ZO1 und CD8 in einer Spätform der Psoriasis	43
Abbildung 16. Zusammenhang zwischen Expression von Claudin-1 und Stadium der Erkrankung	45
Abbildung 17. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 und CD4 in einer Spätform der Psoriasis - Bild 1	47
Abbildung 18. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 und CD4 in einer Spätform der Psoriasis - Bild 2	48
Abbildung 19. Zusammenhang zwischen Cldn-1-Expressionsmuster und Eindringtiefe CD4-positiver Zellen in die Haut	49
Abbildung 20. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 und FoxP3 in einer Spätform der Psoriasis - Bild 1	50
Abbildung 21. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Cldn-1 und FoxP3 in einer Spätform der Psoriasis - Bild 2	51
Abbildung 22. Zusammenhang zwischen Cldn-1-Expressionsmuster und Eindringtiefe FoxP3-positiver Zellen in die Haut.....	52
Abbildung 23. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Stadium der Erkrankung	53
Abbildung 24. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Menge an CD4-positiven Zellen.....	54
Abbildung 25. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Eindringtiefe CD4-positiver Zellen in die Haut	55
Abbildung 26. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Occludin und CD4 in einer Spätform der Psoriasis	56
Abbildung 27. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von Occludin und FoxP3 in einer Spätform der Psoriasis	57
Abbildung 28. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Menge an FoxP3-positiven Zellen.....	58
Abbildung 29. Zusammenhang zwischen Occludin-Expressionsmuster und Eindringtiefe FoxP3-positiver Zellen in die Haut	59
Abbildung 30. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von CAR in gesunder Haut ..	61
Abbildung 31. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von CAR in einem psoriatischen Plaque (Frühform) bei Anwesenheit vieler JAML-positiver Zellen	63
Abbildung 32. Beispiel einer Immunfluoreszenzfärbung von CAR in einem psoriatischen Plaque (Frühform) bei Abwesenheit JAML-positiver Zellen.....	64

11 Anhang

11.1 Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein besonderer Dank gilt

- meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Ingrid Moll für die Ermöglichung der Anfertigung der Dissertation im Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie.
- meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Johanna Brandner für die Überlassung der Arbeit trotz Kenntnis meiner familiären Situation, für die kompetente und engagierte Begleitung der Arbeit und für die stets freundliche und verständnisvolle Betreuung.
- der Medizinisch-technischen Assistentin Ewa Wladykowski für die geduldige Einarbeitung in die immunhistochemischen Färbemethoden und die anschließenden kompetenten Hilfestellungen hierzu.
- allen im Labor tätigen Mitarbeitern, deren Freundlichkeit und Kollegialität eine große Unterstützung waren.
- meinem Ehemann Thomas Eisele für die Wartung meines Computers und die Hilfe beim Layout der Arbeit; aber vor allem für die von Liebe und Nachsicht geprägten Jahre und für die stets liebevolle Erziehung unserer Kinder.
- meinen Kindern Julia und Moritz für das klaglose Akzeptieren der durch diese Arbeit entstandenen Entbehrungen im Familienalltag, für eure Liebe und eure Wertschätzung.

11.2 Lebenslauf

Name	Melanie Sylvia Eisele
Geburtsdatum	06. Dezember 1980 in Müllheim
Geburtsort	Müllheim
Tätigkeit als Ärztin	
Zeitraum	seit 15. August 2013
Position	Assistenzärztin
Arbeitgeber	HELIOS Albert-Schweitzer-Klinik Northeim, Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie, Chefarzt: Dr. Schratz
Dissertation	
Zeitraum	seit 10. Dezember 2010
Arbeitgeber	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Klinik für Dermatologie und Venerologie, Doktormutter: Prof. Dr. Ingrid Moll
Studium	
Zeitraum	01. Oktober 2005 – 25. April 2013
Fach	Humanmedizin
Abschluss	Staatsexamen
Universität	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Praktisches Jahr	
Zeitraum	27. Februar 2012 – 27. Februar 2013
Ausbildungsstätte	Universitätsmedizin Göttingen
Tätigkeit als CTA	
Zeitraum	01. August 2004 – 31. Juli 2005
Position	Technische Assistentin
Arbeitgeber	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, III. Medizinische Klinik, Nephrologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Friedrich Thaiss
Ausbildung zur CTA	
Zeitraum	09. September 2002 – 07. Juli 2004
Abschluss	Staatlich geprüfte Chemisch-technische Assistentin
Ausbildungsstätten	Institut Dr. Flad, Stuttgart NTA Dr. Grübler, Isny im Allgäu
Schulbildung	
Zeitraum	22. August 1987 – 19. Juni 2001
Abschluss	Abitur
Schulen	Grimmelshausengymnasium, Offenburg Mädchengymnasium Unserer Lieben Frau, Offenburg Grundschule Niederschopfheim, Hohberg

11.3 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: