

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten  
- Allgemeine Dermatologie und Venerologie -  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. T. Luger -

**Corneodesmosin und die Genetik der Psoriasis vulgaris  
unter Betrachtung geschlechtsspezifischer Allel-Transmissionen  
im MHC**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung des doctor medicinae  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Vinzenz Oji, geb. Hoppe

aus Potsdam

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. H. Traupe

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. I. Kennerknecht

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Februar 2004

### Zusammenfassung

Vinzenz Oji: **Corneodesmosin und die Genetik der Psoriasis vulgaris unter Betrachtung geschlechtsspezifischer Allel-Transmissionen im MHC**

Ein vielfach bestätigter genetischer Suszeptibilitäts-Lokus der Psoriasis vulgaris befindet sich im MHC nahe HLA-B und -C (*PSORS1/6p21.3*). Vermutlich liegt das oder liegen die in die Pathogenese involvierte/n Gen/e auf dem *ancestralen Haplotypen EH-57.1* (Schmitt-Egenolf et al., 1996). Als Kandidaten-Gen ist das 160 kb distal von HLA-C liegende Corneodesmosin-Gen von hohem Interesse, da es mit der Psoriasis vulgaris assoziiert ist und eine wichtige Rolle im epidermalen Desquamationsprozeß spielen könnte (Zhou und Chaplin, 1993; Guerrin et al., 1998; Jenisch et al., 1999, u. a.).

In Bezug auf diesen Forschungsstand wurde bei 199 deutschen *Falk-Rubinstein-Trios* der Mikrosatelliten-Marker TN62 (proximal von HLA-C) und der Corneodesmosin-SNP \*1243 analysiert, um ihre Allel-Transmissionen in einem *Transmissions/Disequilibrium-Test* (TDT nach Spielman et al., 1993) zu vergleichen. Signifikante *p*-Werte zeigen *Kopplungsungleichgewichte* oder eine direkte pathogenetische Involvierung von Genvarianten an. Im *RC-TDT* nach Knapp (1999) ergab CDSN\*1243 für Allel 2 ( $f = 0,59$ ) ein signifikantes  $p_{\text{exakt}}$  von 0,0084 und TN62 für Allel 4 ( $f = 0,099$ ) ein hochsignifikantes  $p_{\text{exakt}}$  von  $6,2 \times 10^{-7}$  (multiallelischer Test/FBAT;  $P = 0,001$ ;  $df = 20$ ). Zusätzlich wurde im Hinblick auf den oft zu beobachtenden paternalen Effekt der Psoriasis (Traupe et al., 1992) eine „parent-of-origin“-Analyse durchgeführt. Im Vergleich der maternalen und paternalen Transmissionen überwogen bei CDSN\*1243(2) die paternalen Transmissionen ( $p_{\text{mat.}} = 0,023$  zu  $p_{\text{pat.}} = 0,00055$ ), bei TN62(4) dagegen die maternalen Transmissionen ( $p_{\text{mat.}} = 0,96 \times 10^{-5}$  zu  $p_{\text{pat.}} = 0,00159$ ).

Die Ergebnisse sprechen für das Vorliegen eines *Kopplungsungleichgewichts* zwischen CDSN\*1243 und PSORS1. Vermutlich liegen CDSN\*1243(2) und TN62(4) auf unterschiedlichen Haplotypen. Die potentiellen Transmissionseffekte könnten im Sinne einer *genomischen Prägung* interpretiert werden. An die Einflüsse einer *Segregationsdistorsion* oder an die Beteiligung eines *X-chromosomal* Gen sollte gedacht werden, wenn sich in weiteren Untersuchungen der Befund bestätigt, dass es hauptsächlich die Töchter sind, an die die Risiko-Allele transmittiert werden (TN62:  $p_{\text{het.}} = 0,035$ ).

## Inhaltsverzeichnis

	<i>Seite</i>
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Psoriasis vulgaris und Plaque-Psoriasis	- 1 -
1.1.1. Therapie der Psoriasis vulgaris und krankheitsbeeinflussende Faktoren	- 3 -
1.2. Psoriasis pustulosa	- 5 -
1.3. Psoriasis arthropathica	- 6 -
1.4. Allgemeine Begriffe und Grundlagen der genetischen Kartierung	- 7 -
1.4.1. Kopplung versus Assoziation in der Bevölkerung	- 8 -
1.4.2. Kopplungsungleichgewicht	- 11 -
1.4.3. Genomische Prägung	- 13 -
1.5. Epidemiologie der Psoriasis vulgaris	- 15 -
1.5.1. Prävalenz der Psoriasis vulgaris	- 15 -
1.5.2. Zusammenhänge mit anderen Krankheiten	- 16 -
1.6. Histologie der Psoriasis vulgaris	- 17 -
1.7. Immunologie und Pathogenese der Psoriasis vulgaris	- 18 -
1.8. Die Genetik der Psoriasis vulgaris	- 27 -
1.8.1. Vererbungsmodus und Hinweis auf einen paternalen Effekt	- 27 -
1.8.2. HLA-Assoziation und Psoriasis Typ 1/2	- 31 -
1.8.3. Die genetische Kartierung der Psoriasis vulgaris	- 33 -
1.8.4. Biochemie und Genetik von Corneodesmosin	- 37 -
1.8.5. Corneodesmosin und tn62 bei der Feinkartierung im MHC	- 41 -
1.9. Fragestellung	- 44 -
<b>2. Methodik</b>	
2.1. Assoziationsstudie mit internen Kontrollen	- 45 -
2.2. Auswahlkriterien und Auswahlmodus	- 48 -
2.3. Rekrutierung der Familien	- 50 -
2.4. Befragung, Untersuchung und Blutabnahme	- 51 -
2.5. Molekulargenetische Methoden	- 52 -
2.5.1. Prinzip der PCR	- 52 -

	<i>Seite</i>
2.5.2. Prinzip und Technik der Geno-Typisierung mit Mikrosatelliten	- 54 -
2.5.3. Prinzip der SNP-Analyse	- 56 -
2.6. Generieren der Daten im Labor	- 58 -
2.6.1. DNA-Extraktion	- 58 -
2.6.2. DNA-Qualitätskontrolle	- 58 -
2.6.3. Erstellen von Mutterplatten, Verdünnungs- und Tochterplatten	- 59 -
2.6.4. PCR-Ansatz und Programm zur Genotypisierung von tn62	- 60 -
2.6.5. PCR-Ansatz und Programm zur SNP-Analyse	- 61 -
2.6.6. Kapillar-Elektrophorese	- 62 -
2.6.7. Agarose-Gel-Elektrophorese	- 64 -
2.6.8. Restriktionsenzym-Analyse von CDSN*1243	- 65 -
2.6.9. Erfassung der Rohdaten und Datenverarbeitung	- 67 -
2.7. „Mendel-Check“	- 69 -
2.8. Transmissionsdisequilibrium-Test (TDT)	- 69 -
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1. Charakterisierung des Datensatzes	- 70 -
3.1.1. Datensatzgröße	- 70 -
3.1.2. Zahl der Betroffenen	- 70 -
3.1.3. Mittleres Erkrankungsalter	- 71 -
3.1.4. Herkunft der Familien	- 72 -
3.1.5. Triokonstellation	- 72 -
3.2. Genotypisierungsrate	- 73 -
3.3. Häufigkeit und Verteilung der Allele von CDSN*1243	- 73 -
3.4. Heterozygotie und PIC-Werte der Marker	- 75 -
3.5. Ergebnis des TDT	- 75 -
3.6. Maternale versus paternale Vererbung der Psoriasis vulgaris	- 77 -
3.7. Maternale versus paternale Transmission der Allele	- 79 -
3.8. Söhne versus Töchter bei der Allel-Verteilung	- 82 -
<b>4. Diskussion</b>	
4.1. Diskussion der Ergebnisse des Transmissions/Disequilibrium-Test	- 83 -
4.2. Maternale versus paternale Vererbung auf der Ebene des Phänotyps	- 93 -
4.3. Maternale versus paternale Transmission auf Ebene der Marker	- 95 -

	<i>Seite</i>	
4.4.	Söhne versus Töchter bei der Vererbung der Psoriasis vulgaris und bei den Allel-Transmissionen der Marker CDSN*1243 und TN62	- 97 -
4.5.	Aktualisierung und Zusammenfassung der Diskussionspunkte	- 99 -
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	
<b>A.</b>	<b>Anhang</b>	
A1.	Übersicht zur Therapie der Psoriasis vulgaris	
A2.	Dokumentation des benutzten Informationsbogens zur Rekrutierung	
A3.	Dokumentation des benutzten Einverständnis- und Fragebogens	
A4.	DNA-Extraktions-Protokoll	
A5.	Dokumentation der im Labor benutzten Utensilien	

## **Lebenslauf**

## **Danksagung**

# 1. Einleitung

Die Psoriasis ist eine häufige, genetisch determinierte und weltweit vorkommende chronische Hautkrankheit, deren Ätiologie und Pathogenese bislang nur unzureichend geklärt ist. Bei der nicht-infektiösen Krankheit spielen Entzündungsphänomene und epidermale Hyperproliferation eine wichtige Rolle. Tendenziell ist sie in Europa und Nordamerika (Prävalenz in der „kaukasischen“ Bevölkerung 1 – 3 %) stärker verbreitet als beispielsweise in China (Prävalenz 0,5 %). Bereits 1808 hat Willan die ersten abgrenzbaren Kennzeichen der Psoriasis beschrieben (Bhalerao, 1998). Die Schuppenflechte besitzt viele klinische und morphologische Varianten, doch die typische Effloreszenz ist sehr charakteristisch; es handelt sich um scharf begrenzte, in typischer Weise silbrig-weiß schuppene Herde (asbestfarben) auf reichlich rot infiltriertem (lachsfarbenen) und epidermal verdicktem Grund.

Diese Beschreibung gilt insbesondere für die *Psoriasis vulgaris*, der mit 90 % häufigsten Form der Schuppenflechte. Für viele Betroffene geht die Schuppenflechte mit einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität einher. Auch gänzlich andersartige Hauteffloreszenzen oder extrakutane Symptome spielen bei der Psoriasis eine wichtige Rolle (*Psoriasis pustulosa*, *Psoriasis arthropathica*).

Es folgt eine genauere Beschreibung der Klinik der verschiedenen Psoriasisformen.

## 1.1. Psoriasis vulgaris und Plaque-Psoriasis

Das besondere Interesse dieser Arbeit gilt der klinisch häufigsten Form der Schuppenflechte. Aus bestimmten Gründen wurden zur genetischen Untersuchung ausschließlich Betroffene mit *Psoriasis vulgaris* herangezogen (s. Kap. 1.2.).

Bei der *Psoriasis vulgaris* findet sich die klassische oben beschriebene Hautveränderung. Prädilektionsstellen sind die Streckseiten des Körpers (Ellenbogen und Knie). Im Gegensatz zu anderen entzündlichen Hautkrankheiten jucken die betroffenen Stellen eher wenig.

Meist beginnt die Ausbreitung mit einer scharf begrenzten, entzündlichen epidermalen Papel und einer locker darauf haftenden groblamellären Schuppung. Punktförmige Elemente können sich auf Tropfenform, Münzgröße oder durch Zusammenfließen auf ausgedehnte bizarre Formen vergrößern. Grundeffloreszenz ist somit die erythematöse Papel mit ihrer silbrig glänzenden Schuppung. Die typischen u. a. von Person zu Person variierenden



morphologischen Erscheinungsbilder (Morphen) der Psoriasis vulgaris nennt man Psoriasis punctata (meist im akuten Schub), guttata (Tropfenform), nummularis (ein bis mehrere Zentimeter, oval oder unregelmäßig, die häufigste Form) oder Psoriasis geographica. Im Extremfall, z. B. nach übermäßiger Bestrahlung des Körpers, ist das gesamte Integument befallen: Psoriatische Erythrodermie.

Viele Psoriasis-Patienten können berichten, dass sich die typischen Läsionen an Hautstellen entwickeln, an denen es vorher zu Verletzungen oder zu häufiger Beanspruchung gekommen ist (Farber et al., 1968). Dieser krankheitstypische Aspekt ist unter dem Begriff des Köbner-Phänomens („isomorphen Reizeffekt“) bekannt. Dabei provozieren exogene Irritationen an einer Hautstelle genau an dieser neue psoriatische Herde (Boyd und Neldner, 1990). Für die Diagnose-Sicherung der Psoriasis vulgaris sind die Psoriasis-Kratz-Phänomene wichtig und hilfreich (Tab. I.1.). Von besonderer Bedeutung in unseren Untersuchungen ist ebenfalls die Beurteilung der Finger- und Zehennägel auf Anzeichen einer eventuell latent vorhandenen Psoriasis: Tüpfelnägel, d. h. viele kleine Einziehungen der Nagelplatte, Onycholysen am Nagelrand oder in der Mitte („Ölfleck“) sind – richtig beurteilt – charakteristische Kennzeichen einer Psoriasis-Betroffenheit bzw. -Krankheitsveranlagung.

#### ÜBERSICHT

Kerzentropfphänomen	Die locker haftenden Schuppen lassen sich als Ganzes abheben wie ein Tropfen an einer Kerze.
Kerzenphänomen (Zeichen der Hyperkeratose)	Kratzt man über die Schuppung am Psoriasis-Herd, fallen Schuppen wie von einer Stearin-Kerze abgeschabt herunter.
<u>Phänomen des letzten Häutchens</u> (sehr charakteristisch)	Nach Ablösen der Schuppung lässt sich durch Kratzen plötzlich ein sehr feines, dünnes, glänzendes Häutchen vom Herd entfernen.
Phänomen des blutigen Tau, sog. Auspitz-Phänomen (Zeichen einer Akanthose)	Das Ablösen dieser letzten Epidermisschicht verletzt leicht die sehr oberflächlich liegenden Gefäße der Papillenspitzen und zeigt eine feine schmerzlose, punktförmige Blutung.

Tab. 1.1.: Zum Auslösen der Phänomene benutzt man einen Holzspatel. Das Auspitz-Phänomen kommt auch bei anderen psoriasiformen Dermatosen vor, z. B. dem Morbus Reiter oder der Pityriasis rubra pilaris.

Nach dem Verteilungsmuster der Hautläsionen - die häufigsten Stellen sind Knie, Ellenbogen, Fußknöchel, Bauchnabel und Sakralregion - und dem Verlauf der Krankheit unterscheidet man ferner einige typische klinische Varianten der Psoriasis (Auswahl):

- 1.) Eruptive (exanthematische) Psoriasis (Rumpf, proximale Extremitäten, „Guttata“-Form)
- 2.) Plaque-Typ-Psoriasis (*chronisch-stabil, häufigster Typ*)
- 3.) Seborrhoischer Typ (Rumpf, Kapillitium, weniger Schuppung)
- 4.) Psoriasis der Kopfhaut (fast bei 50 % der Betroffenen involviert)
- 5.) Psoriasis inversa (keine streckseitenbetonte Verteilung, sondern Befall der intertriginösen Areale)
- 6.) Erythrodermische Psoriasis (s. o., Rötung steht gegenüber Schuppung im Vordergrund, extrem entzündlicher Charakter)

Die Erstmanifestation der Psoriasis, die prinzipiell in jedem Alter möglich ist, ereignet sich bei jüngeren Patienten häufig während der Pubertät (Whyte et al., 1964; Nyfors et al., 1975). Typisch ist hier die exanthematisch kleinfleckige Psoriasis guttata, bei der angenommen wird, dass ihr in 80 % der Fälle eine Streptokokken-Infektion vorausgeht (Barker et al., Juli 1991). Valdimarsson und Mitarbeiter (1997) vermuten hier eine T-Zell-spezifische Kreuzreaktion des bakteriellen M-Proteins mit bestimmten Keratin-Proteinen. Der weitere Krankheitsverlauf lässt sich nicht vorhersagen. Die Hautläsionen können sich spontan zurückbilden oder sich in eine chronische Verlaufsform (vom Plaque-Typ) entwickeln.

#### 1.1.1. Therapie der Psoriasis vulgaris und krankheitsbeeinflussende Faktoren

Eine Therapie, die Psoriasis dauerhaft ausheilen könnte, ist bisher nicht gefunden worden und kann es wegen der erheblichen genetischen Komponente auch noch nicht geben. Zur Verfügung steht jedoch ein breites Spektrum symptomatisch wirkender Mittel, mit denen sich die Psoriasis meistens gut behandeln lässt. Für therapiebedürftige Betroffene ist die Behandlung jedoch mit viel Zeitaufwand verbunden.

Die grundsätzlichen Therapieoptionen umfassen topische Therapieverfahren, bei denen Wirkstoffe wie Retinoide oder Vitamin-D-Analoga als Salbe auf die Haut gebracht werden, oder systemische Behandlungen wie z. B. Retinoide oder Medikamente, die die Immunantwort modulieren (z. B. Ciclosporin A, Methotrexat oder Fumarsäure-Ester). Eine weitere Behandlungsmöglichkeit besteht in dem Einsatz von UV-Licht, wobei insbesondere

ein schmales Aktionsspektrum im UV-B-Bereiche um 312 nm bevorzugt angewandt wird. Der UV-A-Wellenbereich lässt sich nutzen, wenn gleichzeitig lichtverstärkende Medikamente wie Psoralene (Psoralen + UV-A ~ PUVA) im Sinne einer Photochemotherapie gegeben werden. Auch für die UV-Lichttherapie dürfte die in der Haut bewirkte Immunsuppression einen wesentlichen Wirkmechanismus darstellen. Letztendlich geht deren Anwendung auf die von vielen Patienten persönlich gemachte Erfahrung zurück, dass sich ihre Hauterkrankung unter der häufigeren Einwirkung von Sonnenlicht im Sommer deutlich bessert und sich manchmal sogar eine Vollremission einstellt. Farber und Nall (1974) berichteten, dass 90 % von 2627 Patienten klagten, kaltes Wetter verschlimmere ihre Psoriasis, während 80 % von 3280 Patienten unter Sonnenlicht eine Verbesserung feststellten.

Wie sich an diesem Beispiel zeigt, steht das Krankheitsgeschehen der Psoriasis unter dem Einfluss von Umweltbedingungen und Lebensgewohnheiten. Viele Faktoren wurden in epidemiologischen Studien identifiziert. Naldi und Mitarbeiter (1996) beschrieben eine positive Assoziation des BMI (body mass index) mit der Psoriasis und deuteten an, dass sich das Einhalten einer „mediterranen Diät“ positiv auf das Krankheitsgeschehen auswirken kann. Rauchen, Alkohol-Konsum und Stress stellten dagegen Risikofaktoren für das Auftreten und eine Verschlimmerung der Krankheit dar (Braathen et al., 1989; Naldi et al., 1992; Gupta et al., 1993; Piokolainen et al., 1994). Das relative Risiko, an Psoriasis zu erkranken, ist bei einem täglichen Konsum von mehr als 20 Zigaretten signifikant erhöht (Mills et al., 1992). Der bereits von Farber und Nall (1968) oder Gaston und Mitarbeiter (1987) beschriebene Zusammenhang von Psoriasis und Stress wurde auch durch neuere Experimente bestätigt. So zeigen Schmid-Ott und Mitarbeiter (1998) im Versuch, dass bei Psoriasis-Patienten eine erhöhte stressinduzierte Immunantwort gemessen werden kann.

Wenn eine Therapie notwendig wird, so richtet man sich nach dem Erkrankungstyp und dem Schweregrad, der - zumindest was die unmittelbare Involvierung der Haut betrifft - mit Hilfe des PASI-Scores (psoriasis area and severity index) in etwa abgeschätzt werden kann. Die individuell unterschiedlichen Möglichkeiten zur positiven Beeinflussung des Krankheitsgeschehens durch eine angepasste Lebensführung dürfen bei der Therapie nicht vergessen werden. Wichtig ist auch die kontinuierliche Anwendung von lokalen Hautpflegemitteln, d. h. von Salben, eventl. auch mit Harnstoffzusätzen.

Der erfolgreiche, aber mit vielen Nebenwirkungen verbundene Einsatz systemischer immunsuppressiver Präparate wie Ciclosporin A oder Fumarsäure-Ester hat die pathophysiologischen Konzepte zur Psoriasis nachhaltig beeinflusst (Lehmann und Ruzicka, 1996; Schöpf und Augustin 1996, Altmeyer und Nüchel, 1996; Fritsch, 1997). Man geht

davon aus, dass bei der Psoriasis eine immunologische Reaktion vom TH<sub>1</sub>-Typ stattfindet, die für die Erkrankung wesentlich ist (s. u.). Im Anhang (Tab. 1.1.) werden die wichtigsten Behandlungsmöglichkeiten und deren Nebenwirkungen aufgeführt.

## 1.2. Psoriasis pustulosa

Die Psoriasis pustulosa stellt eine Sondergruppe Psoriasis-verwandter Dermatosen dar. Die Grundeffloreszenz ist sehr unterschiedlich zur Psoriasis vulgaris. Sie besteht aus multiplen intraepidermalen, weiß-gelblichen Pusteln auf geröteter Haut. Der Inhalt der berührungsschmerzhaften Pusteln ist steril (Leukozytenansammlungen). Die Histologie deutet auf gemeinsame ätiologisch-pathogenetische Faktoren mit der Psoriasis vulgaris hin (Munro-Mikroabszesse s. u.). Dieser Zusammenhang gilt besonders für die generalisierte Psoriasis pustulosa vom Typ Zumbusch und vom zirzinären Typ. Bei diesen beiden Formen der Psoriasis pustulosa kann es zu einem Manifestationswechsel der Krankheit hin zur Psoriasis vulgaris (und vice versa) kommen.

- Die generalisierte Psoriasis pustulosa (Typ Zumbusch) gilt als sehr schwere Ausprägung einer Psoriasis. Sie kann mit erheblichen allgemeinen Krankheitssymptomen einher gehen: Unter Umständen komplette Erythrodermie, multiple konfluierende sich eröffnende und schuppende Pusteln („Eiterseen“), hohes Fieber, körperlicher Verfall, tetanische Krämpfe (Hypokälzämie), etc.. In der Regel kommt es jedoch zur Spontanremission nach Wochen. Arthralgien sind häufig assoziiert; bemerkenswert ist analog zur Psoriasis arthropathica die Assoziation mit HLA-B<sub>27</sub>.
- Eine wichtige lokalisierte Form der Psoriasis pustulosa ist die chronisch rezidivierende, therapieresistente Psoriasis pustulosa palmoplantaris (Typ Barber). Im Gegensatz zum Psoriasis vulgaris Typ1 ist bei ihr bisher keine Korrelation mit HLA-Antigenen bekannt.

Zur Therapie lokaler und systemischer Formen der Psoriasis pustulosa eignen sich (anfangs) besonders gut Retinoide (Acitretin). In chronischen oder schweren Fällen ist man häufig auf eine Kombinationstherapie, Photochemotherapie und auf Methotrexat angewiesen.

Die Krankheitsausprägungen und unterschiedlichen HLA-Assoziationen lassen vermuten, dass es sich bei den Formen der Psoriasis pustulosa - insbesondere bei der palmoplantaren Pustulosis – um eigenständige Entitäten handelt, die sich von der Psoriasis vulgaris deutlich unterscheiden. Um eine möglichst homogene Krankengruppe zu haben, haben wir uns bei unserer Untersuchung auf die Psoriasis vulgaris beschränkt.

### 1.3. Psoriasis arthropathica

Die zweithäufigste Form der drei Psoriasis-Typen ist die Psoriasis arthropathica, die als eine seronegative Spondyloarthropathie zumeist mit den für Psoriasis typischen Hauteffloreszenzen einhergeht, sich aber auch nur auf die extrakutanen Symptome beschränken kann. Die Prävalenz der klinisch relevanten Arthropathie bei Psoriasis vulgaris beträgt 5 - 10 %; noch häufiger geht die Psoriasis pustulosa mit einer Gelenkbeteiligung einher. Die Psoriasis arthropathica ist wie die Psoriasis pustulosa mit HLA-B<sub>27</sub> assoziiert (Metzger et al., 1975). Im Gegensatz zur Psoriasis pustulosa liegt bei der Psoriasis arthropathica zusätzlich eine HLA-Cw6-Assoziation wie bei der Psoriasis vulgaris Typ1 vor (Svejgaard, 1974; Ward, 1978). Folgende drei Formen der Arthropathie können unterschieden werden:

- Der periphere Typ betrifft meist ein oder mehrere Interphalangealgelenke der Finger oder Zehen, wobei man im Vergleich mit der chronisch rheumatoiden Arthritis eine eher asymmetrische Verteilung der Gelenksentzündungen findet (Befall in einem „Fingergelenkstrahl“).
- Isoliert oder in Kombination mit den anderen Typen kann auch eine Monoarthritis großer Gelenke vorherrschen (Knie, Hüfte, Sprunggelenk).
- Der axiale Typ (Entzündung der Wirbelsäulengelenke und/oder Sakroiliakalgelenke) ist vom Morbus Bechterew abzugrenzen und kann ebenfalls in Kombination mit den anderen beiden Typen auftreten.

Charakteristisch für alle Typen ist die begleitende schmerzhaftes Enthesiopathie, d. h. die Beteiligung der die Gelenke umgebenden Weichteilstrukturen. Die Diagnosestellung ist nicht auf den Ausschluß einer PCP oder eines M. Bechterews beschränkt. Bei Verdacht auf Psoriasis arthropathica ist eine genaue dermatologische Untersuchung auf Psoriasis-Zeichen erforderlich. Oft lässt sich an den arthritisch betroffenen Fingern eine ausgeprägte Nagelpsoriasis bis hin zu einer Nageldystrophie beobachten.

Das Manifestationsalter einer Psoriasis arthropathica liegt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Für den Betroffenen können sich schwerwiegende funktionelle Einbußen des Bewegungsapparates und insbesondere der Hand entwickeln. Im schlimmsten Fall kommt es zu einer Verstümmelung (Arthritis mutilans), der man mit einer wirkungsvollen systemischen Therapie (Methotrexat, Cyclosporin) rechtzeitig entgegen wirken sollte.

#### 1.4. Allgemeine Begriffe und Grundlagen der genetischen Kartierung

In diesem Abschnitt werden einige wichtige Begriffe und Grundlagen aus der Molekulargenetik erklärt.

Die im Jahr 2000 erreichte vorläufige („draft“-) Sequenzierung des menschlichen Erbguts spiegelt die Absicht der Molekularbiologen und Mediziner wider, die Funktion der Gene – zumindest diejenigen mit besonderer klinischer Relevanz – besser verstehen zu können. Tatsächlich ist die Kenntnis der DNA-Sequenz eine wichtige Vorarbeit zur Entschlüsselung genetisch determinierter Krankheiten wie der Psoriasis vulgaris. Sie ermöglicht eine genaue Kartierung der DNA, die Bestimmung der genetischen Marker oder die Bereitstellung von sog. Kandidatengenen.

Auf diesen unverzichtbaren Hilfsmitteln basieren die Studien-Methoden zur Identifizierung von Krankheitsgenen:

- 1) Kopplungsanalysen
- 2) Assoziationsstudien/Kopplungsungleichgewichtsstudien

Mit Hilfe von Kopplungsanalysen kartiert man chromosomale Regionen, d. h. sog. *Suszeptibilitätsloci*. Mit dieser Methode kann für jede Krankheit, bei der eine genetische Ätiologie in Frage kommt, ein eventuell verantwortlicher Ort (*Locus*) auf der DNA gesucht werden. Die Struktur dieses DNA-Abschnitts kann zunächst unbekannt sein (Lander und Schork, 1994). Prinzipiell ist es daraufhin jedoch möglich, in dieser Region ein bereits bekanntes Gen zu ermitteln oder dort ein neues Gen durch positionelle Klonierung mit rekombinanter DNA zu isolieren. Ist der Zusammenhang der Krankheit mit einem bestimmten Gendefekt noch nicht bewiesen, spricht man von *Gen-Loci* oder *Suszeptibilitäts-Regionen* einer Krankheit. In der Regel ist es eine wichtige Aufgabe, den oft noch zu langen DNA-Abschnitt weiter einzugrenzen. Hier kommen vor allem *Kopplungsungleichgewichts-*Untersuchungen in Betracht, die zum Beispiel den Nachweis erbringen, dass bestimmte krankheitsverursachende Mutationen auf einem bestimmten *ancestralen* Haplotyp entstanden sind. Technisch gesehen handelt es sich um Assoziationsstudien, bei denen bestimmte Allele, die den Suszeptibilitäts-Haplotyp ausmachen, analysiert werden. Endgültiges Ziel ist der Nachweis einer funktionell relevanten Genmutation bei Individuen mit der Krankheit und eine Erklärung zur Involvierung des Gens im Krankheitsgeschehen.

Von genetisch komplexen Krankheiten spricht man im weitesten Sinne, wenn sich deren Vererbungsmuster nicht mit einem klassischen, rezessiven oder dominanten Mendel'schen Erbgang überein bringen lässt. Meist ist es nicht möglich, in diesen Stammbäumen einen

genetischen Marker zu finden, der perfekt mit der Erkrankung cosegregiert. Oft sind mehrere Gene, eventl. auch Gene mit gegenregulatorischen Einflüssen, am Krankheitsgeschehen beteiligt. Zu den Charakteristika dieser genetisch determinierten Krankheiten gehören im Einzelnen (Lander und Schork, 1994):

- 1) Inkomplette Penetranz des Genotyps
- 2) Heterogenität: Mehrere Mutationen an verschiedenen Stellen können den gleichen Phänotyp verursachen.
- 3) Polygene Vererbung: Mehrere Gene und deren Mutationen im Zusammenspiel verursachen eine Krankheit. Hier vermutet man, dass Schwelleneffekte eine wichtige Rolle für die Ausprägung der Krankheit spielen.
- 4) Multifaktoriell
- 5) Alternative Transmissionsmechanismen wie mitochondriale Vererbung oder Genomisches Imprinting (Kap. 1.4.3.)

Die Entschlüsselung genetisch komplexer Krankheiten erfordert große Datenmengen und oft aufwendige statistische Testverfahren.

#### 1.4.1. Kopplung versus Assoziation in der Bevölkerung

Unter einem Allel versteht man die Zustandsform („Ausprägung“) eines Gens oder eines genetischen Markers. Liegen Allele auf unterschiedlichen Chromosomen, werden sie nach den einfachen Mendel'schen Vererbungsregeln mit einer jeweiligen Wahrscheinlichkeit von 50 % auf die nachfolgende Generation übertragen. Sind jedoch zwei Allele benachbart auf einem gemeinsamen Chromosom gelegen, beobachtet man möglicher Weise eine gekoppelte Vererbung. Die Wahrscheinlichkeit, in der Meiose nicht voneinander getrennt, d. h. rekombiniert, zu werden, ist vom Ausmaß der Nachbarschaft der Allele abhängig. Allele von sehr eng benachbarten Genen lassen sich deshalb auch noch nach mehr als 20 Generationen gemeinsam nachweisen. Die Kombination von wenigstens zwei Allelen wird als Haplotyp bezeichnet. Daneben gibt es extendierte *ancestrale* Haplotypen, die meistens weit mehr als zwei verschiedene Allele umfassen (Gonçalo et al., 2001). Zu einer Umgestaltung von Haplotypen kommt es während der Meiose in den Keimzellen. Hier findet zwischen den homologen Chromosomen ein gegenseitiger Austausch genetischen Materials statt (Crossing-Over). Zuvor nebeneinander gelegene und gemeinsam transmittierte DNA-Abschnitte können dabei getrennt werden und segregieren dann unabhängig. Dieser Vorgang der Trennung und

des Austausches von Allelen und somit der Umgestaltung von Haplotypen wird als Rekombination bezeichnet, wobei die Rekombinations-Wahrscheinlichkeit ( $\theta$ ) stark vom Abstand der Allele beeinflusst wird. Um so mehr DNA-Basen zwischen ihnen liegen, um so wahrscheinlicher ist ein trennendes „Crossing-over“ in diesem Bereich. Dieser Zusammenhang erlaubt bei der genetischen Kartierung mit Hilfe der klassischen Kopplungsanalyse eine Abstandsdefinition in Centimorgan ( $1 \text{ cM} = 1 \% \theta$ ). Für den physikalischen Abstand ist wegen der unterschiedlichen Verteilung der Crossing-Over im menschlichen Genom („Hotspots“ etc.) nur eine ungefähre Relation herstellbar ( $1 \text{ cM} \sim 1 \text{ Megabase}$ ). Bei Assoziations-Studien mit Allelen aus Regionen, in denen sich Kopplungsungleichgewichte befinden, entsprechen einem cM wahrscheinlich weit weniger oder nur 200 kb bis 500 kb (Gonçalo et al., 2001).

Ab wann spricht man von Kopplung? Und wie findet man sie heraus?

Ergibt sich bei syntän, d. h. auf einem Chromosom, liegenden Loci eine Rekombinationsfrequenz von 50 %, entspricht dies einer unabhängigen Vererbung so wie bei Loci, die auf zwei unterschiedlichen Chromosomen liegen. Von einer Kopplung (engl.: „linkage“) spricht man, wenn Loci eine beobachtete Rekombinationsfrequenz von deutlich weniger als 50 % zeigen.

Zur Kopplungsanalyse genetischer Krankheiten gibt es im wesentlichen zwei Berechnungsmodelle: Parametrische Methoden und nicht-parametrische Methoden. Bei einfach mendelnden Erbgängen berechnet man die sog. LOD-Scores (Morton, 1955). Hierfür benötigt man eine Reihe von Großfamilien mit möglichst drei oder mehr Generationen, bei denen sich die „Meiosen-Phasen“ genau bestimmen lassen. Unter der Annahme eines ausgewählten Vererbungsmodells und der Phänotypierate sowie der Penetranz errechnet man für die einzelnen Großfamilien das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit von Kopplung bei einer gegebenen Rekombinationsfrequenz  $\theta$  zur Wahrscheinlichkeit von Nicht-Kopplung ( $\theta = 50 \%$ ). Der Quotient lautet somit:

$$\frac{\text{Wahrscheinlichkeit des beobachteten Familien-Stammbaums, wenn } \theta = 0,1}{\text{Wahrscheinlichkeit des beobachteten Familien-Stammbaums, wenn } \theta = 0,5}$$

Übereinkunftsgemäß berechnet man diesen Wert als Logarithmus in Abhängigkeit von der Rekombinationsfraktion  $\theta$  {„logarithm of the odds“; LOD-Wert  $Z(\theta)$ }. LOD-Werte von  $Z(\theta) > 3$  gelten als eine Bestätigung von Kopplung; ein  $Z$  unter  $-2$  wird als Beweis von



Nicht-Kopplung angesehen. Bei  $Z(\theta) = 3$  ist die Chance für Kopplung somit 1.000 : 1. Wenn man einen LOD-Score von 3 mit der Aussagekraft eines klassischen p-Wertes, wie er Medizinern aus z. B. Medikamenten-Testungen vertraut ist, vergleichen möchte, muss folgender Zusammenhang bedacht werden. Die *a priori*-Wahrscheinlichkeit für Kopplung zwischen dem *trait* („Krankheitslokus“) und dem benutzten Markerlokus ist nicht etwa Null, sondern beträgt in etwa 1/50 (Strachan und Read, 1996). Mit anderen Worten, ein LOD-Score von 3 entspricht in etwa einem p-Wert von 0,05. LOD-Score-Werte mehrerer Familien lassen sich addieren. Der höchste LOD-Score-Wert bei einer bestimmten Rekombinationsfrequenz  $\theta$  entspricht gleichzeitig dem wahrscheinlichsten Abstand der untersuchten Loci, d. h. dem genetischen Abstand zwischen Krankheits- und Marker-Lokus.

Bei Krankheiten wie der Psoriasis vulgaris fehlt für aussagekräftige LOD-Werte häufig die Kenntnis des richtigen Vererbungsmodus in den Stammbäumen. Diese können nur in sehr aufwendigen „Maximierungs-Analysen“ modelliert werden oder werden relativ willkürlich festgelegt. Allel-Sharing-Methoden (Weeks und Lange, 1988) kommen dagegen ohne Vererbungsmodelle und Parameter wie Phänotyp und Penetranz der jeweiligen Allele aus. Am einfachsten ist die Geschwisterpaar-Untersuchung („affected sib pair analysis“), bei der man nach identisch vererbten DNA-Regionen (IBD ~ „identical by descent“) sucht, die häufiger als nach Mendel'scher Segregation erwartet bei zwei betroffenen Kindern vorkommen. Auch die ebenfalls nicht-parametrische Kopplungs-Analyse (NPL, Kruglyak et al., 1996) berücksichtigt nur betroffene Familienangehörige. Bei komplexer Genetik gelten nicht-parametrische Verfahren im Vergleich zu den parametrischen Kopplungsmodellen als allgemein robuster, häufig aber als weniger empfindlich (Abreu et al. 1999).

Die Begriffe Kopplung und Assoziation müssen klar auseinander gehalten werden. Während Kopplungsanalysen Positionen von Loci in einzelnen Familien betrachten, untersuchen Assoziationsstudien die Beziehung von Allelen in einer Patientengruppe, z. B. einer Kohorte von vielen Kleinfamilien (Trios). Es wird getestet, ob ein bestimmtes Allel mit signifikant höherer Frequenz bei den Betroffenen gegenüber den Nicht-Betroffenen einer Krankheit vorkommt („Korrelation statt Familien-Cosegregation“, Lander und Schork, 1994). Es handelt sich bei den Assoziationsstudien entweder um Fall-Kontroll-Studien, deren Qualität sehr von der Auswahl der Kontrollgruppe abhängt, wenn man ein Fall-Kontroll-Design als Studienansatz wählt, oder aber um Familien-basierte Assoziationsstudien. Es sollte eine möglichst homogene Bevölkerung ausgewählt werden. Das Problem der interferierenden Bevölkerungsstruktur lässt sich in Test-Methoden mit „internen Kontrollen“ teilweise

beheben („HRR“, Falk und Rubinstein, 1993;). Zum Transmissions/Disequilibrium-Test (TDT, Spielman et al., 1993) folgt in Kapitel 2.1. eine genauere Beschreibung.

Um dem potentiellen genetischen Defekt bei einer Krankheit näher zu kommen, können beliebige polymorphe DNA-Abschnitt auf eine Assoziation hin untersucht werden. Von besonderer Relevanz sind natürlich die bereits bestehenden Suszeptibilitäts-Loci, die es weiter einzugrenzen gilt.

Eine positive Assoziation eines Allels mit einer bestimmten Krankheit kann aus drei Gründen entstehen:

- 1) Das gewisse Allel ist selbst für die Entstehung der Krankheit mitverantwortlich, d. h. die genetische Anlage könnte generell die Krankheitsursache darstellen. (Eine positive Assoziation müsste man dann in den meisten untersuchten Populationen finden.)
- 2) Die Assoziation ergibt sich als Artefakt auf Grund einer inhomogenen Bevölkerungsstruktur. (Größere Gefahr bei den einfachen Fall-Kontroll-Studien.)
- 3) Eine positive Assoziation taucht auf, wenn sich das Allel in einem *Kopplungsungleichgewicht* mit dem die Krankheit tatsächlich verursachenden DNA-Abschnitt befindet.

#### 1.4.2. Kopplungsungleichgewicht

Kurz gesagt beschreibt der Begriff des Kopplungsungleichgewichts das Auftreten einer „nicht durch Zufall erklärbaren Assoziation von Allelen an gekoppelten DNA-Abschnitten“ (Lynn et al, 1995). Die Entstehung des Kopplungsungleichgewichts kann man sich so vorstellen, dass vor vielen Generationen bei einem Urahn zwischen einem Krankheitsgen und bestimmten DNA-Polymorphismen eine enge Lagebeziehung bestanden hat. Kommt es in der demographischen Entwicklung der Population nun beispielsweise zur Abwanderung weniger Träger mit diesem Ur-Haplotyp, kann sich dieser Ur-Haplotyp an anderer Stelle unter besseren Lebensbedingungen in einer expandierenden Population „klonal“ vermehren. Damit wäre recht wahrscheinlich, dass scheinbar nicht miteinander verwandte Personen in dieser Bevölkerung den chromosomalen Abschnitt der Krankheit von einem gemeinsamen Vorfahren geerbt haben („bottleneck hypothesis“, Collins et al., 1999; „founder effekt“, Terwilliger und Weiss, 1998; Jorde et al., 1998). Um dieses Phänomen besser zu verstehen, muss man bedenken, dass die heute in Europa lebenden Bevölkerungen sehr wahrscheinlich auf nur wenige Vorfahren zurückzuführen sind, die vor etwa ca. 44.000 Jahren Afrika

verlassen haben. Diese Theorie ergibt sich einerseits aus den Erkenntnissen der Archäologie, andererseits wird sie durch die Untersuchungen zur Vererbung der „non-recombining region“ des humanen Y-Chromosoms (Underhill et al., 2000) und aus Analysen der mitochondrialen DNA (Quintana-Murci et al., 1999) getragen. Über die Generationen hinweg minimieren sich in einer expandierenden Population die Kopplungsungleichgewichte.

Auf jeden Fall hat das Phänomen des Kopplungsungleichgewichts für die Genomanalyse enorme Bedeutung. Wenn ein Kopplungsungleichgewicht Ursache einer Assoziation ist, sollte man nahe dem Locus A ein Gen entdecken, das bei Menschen mit der Krankheit D mutiert ist (Lander und Schork, 1994). Anders ausgedrückt: Gibt es auf einem DNA-Abschnitt ein Allel, welches zu einer Krankheit prädisponiert und befindet es sich gleichzeitig im Kopplungsungleichgewicht mit Allelen mehrerer in der Nähe liegender Marker-Loci, lässt sich dieser Umstand zur Kartierung von Krankheitsgenen ausnutzen (Terwilliger und Weiss, 1998). Der Begriff umfasst somit die Präsenz der beiden Begriffe *Kopplung* und *Assoziation* gleichzeitig: Kopplung zwischen Marker/n und Krankheitsgen/en und Assoziation zwischen Marker/n und Krankheit (Spielman und Warren, 1996). Ein approbates Mittel in der Genomanalyse zur Aufsuchung von Kopplungsungleichgewichten ist der Transmission/Disequilibrium-Test (TDT) von Spielman und Mitarbeitern (1993).

Es stellt sich die Frage, welche Population sich am besten zur Suche eines Krankheitsgens eignet. Nach Terwilliger und Weiss (1998) sollte die Häufigkeit der jeweiligen Krankheit beim Menschen berücksichtigt werden. Die Genanalyse seltener Krankheiten lässt sich gut in expandierenden Populationen durchführen. Zum Beispiel ist eine sehr große Bevölkerungsexpansion für Europa nach dem Ende der Eiszeit vor ca. 16.000 Jahren anzunehmen.

Assoziationen aufgrund von Kopplungsungleichgewichten können in unterschiedlichen Bevölkerungen sehr widersprüchlich sein. In einer Bevölkerung kann das Allel A positiv assoziiert sein, während dies bei Menschen in einem entfernten geographischen Raum für Allel B der Fall ist, weil hier z. B. eine andere Gründer-Mutation erfasst wird. Bei der Psoriasis vulgaris sind als Beispiel die unterschiedlichen HLA-Assoziationen von Japanern und Europäern anführbar (Nakagawa et al., 1990, Henseler und Christopher, 1985). Wie Underhill und Mitarbeiter (2000) anhand der Analyse der y-chromosomalen Haplotypen der „non-recombining region“ (NRY-Region) festgestellt haben, gehören Europäer ganz überwiegend zum entsprechenden Haplotyp VI und IX, Japaner hingegen zum Haplotyp IV.

Ein Kopplungsungleichgewicht findet man gewöhnlich nur mit Markern, die in einem Bereich von ca. 500 kb DNA vom Krankheitsloкус entfernt liegen (Gonçalo et al., 2001).

### 1.4.3. Genomische Prägung

Wie in der Aufzählung in Kapitel 1.4. bereits angesprochen, kommt es unter dem Einfluss einer genomischen Prägung zu Abweichungen von den Mendel'schen Regeln.

Der ursprünglich aus der Verhaltensforschung stammende Begriff der Prägung (Konrad Lorenz, 1952) taucht als eine Definition besonderer genetischer Ereignisse als erstes in der Arbeit von Helen Crouse (1960) auf: Ein Chromosom aus der männlichen Keimzelllinie erhalte eine gewisse Prägung, die zu anderen Resultaten führe, als wenn das gleiche Chromosom aus der mütterlichen Linie stammte. Zahlreiche weitere Autoren haben den Begriff entsprechend ihren Beobachtungen modifiziert. Erwähnenswert sind einige interessante Untersuchungen:

Die Kerntransplantationsversuche von Surani (1986) und Solter (1988) an Eizellen von Mäusen bewiesen, dass für eine normale Entwicklung des Embryos sowohl der mütterliche als auch der väterliche Pronukleus erforderlich ist. Interessanter Weise zeigte die künstlich erzeugte „Parthenogenese“ (~ eingeschlechtliche Fortpflanzung) mit „gynogenonen Embryonen“ (Zygote ist aus zwei mütterlichen Vorkernen entstanden) eine bevorzugte Entwicklung embryonalen Gewebes, wohingegen aus „androgenem Gewebe“ bevorzugt Plazenta- und Eihautgewebe entstand. Als analoges Beispiel beim Menschen lässt sich die Blasenmole anführen, bei der es offenbar in Folge einer Dispermie zu einer Fehlbildung aus Plazentagewebe kommt (Lawler et al. 1982).

In Translokationsexperimenten mit bestimmten autosomalen Segmenten von Mäusen fanden Cattanach und Kirk (1985) heraus, dass sich bei paternalen uniparentalen Disomien entgegengesetzte Entwicklungs-Effekte gegenüber maternalen uniparentalen Disomien zeigen. Von einer uniparentalen Disomie (UDP) spricht man in Fällen, wo homologe Chromosomenpaare oder Chromosomenteile von nur einem Elternteil geerbt werden. Ein derartiges Phänomen lässt sich beispielsweise beim Prader-Willi-Syndrom beobachten, wenn beide Chromosomen 15 von der Mutter geerbt werden. Cattanach und Kirk (1985) folgerten aus ihren Beobachtungen, dass einzelne autosomale Regionen in den elterlichen Keimzellen unterschiedlich genetisch geprägt sein müssten.

Einen besonderen Fortschritt ergab die Analyse von Genen in transgenen Mäusen. Erstaunlicher Weise fand man bei einem Viertel aller auf die Mäuse übertragenen und untersuchten „fremden“ Gene eine unterschiedlich starke Expression, die davon abhing, welcher Elternteil das jeweilige Gen transmittierte. Eine verminderte Expression schien mit

einem erhöhten Methylierungszustand der Transgene im Zusammenhang zu stehen. (Sapienza et al., 1987; Hall, 1990).

Verschiedene Syndrome des Menschen stehen mit einer genomischen Prägung im Zusammenhang. Dazu gehören das oben erwähnte Prader-Willi- (Butler et al., 1986), das Angelman-Syndrom (Knoll et al., 1987) und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (Reik et al., 1995). Auch bei der Entstehung maligner Tumoren stößt man auf das Phänomen: Der Verlust an Heterozygotie kann ein „verdecktes“ Tumor-Gen aktivieren. Bei der Onkogenese der Glomus-Tumoren fällt auf, dass es bei paternalen gegenüber maternalen Chromosomenverlusten zu konträren Entwicklungen kommt (Van der Mey, 1989).

Die DNA-Methylierung wird inzwischen als ein epigenetisches Signal aufgefasst, das die Expression von Genen reprimiert und damit einen wichtigen Determinierungsfaktor in der Zelldifferenzierung darstellt. Die Methylgruppe bindet bevorzugt an die Base Cytosin in CpG-Inseln. Diese methylierten CpG-Inseln erhalten sich über die DNA-Replikation hinweg, ihr Methylierungszustand ist jedoch reversibel. Auf diese Art und Weise kann das Methylierungsmuster in jeder Gametogenese neu an das Geschlecht angepasst werden. Ein gutes Beispiel für die epigenetisch beeinflusste „Gen-Steuerung“ geben die Untersuchungen zum „*insulin like growth factor 2*“ der Maus: Das Gen des *Igf2* ist, wenn es aus der paternalen Keimzelllinie stammt, unmethyliert und somit potentiell aktiv. Das Gen eines Rezeptors (M6p/Igf2r), der für den Abbau dieses potenten Wachstumsfaktors zuständig ist, liegt dagegen nur von der Mutter vererbt aktiv vor, d. h. das maternale Rezeptorgen für den Abbau ist nicht methyliert. Damit fördert das paternale Gen das Wachstum, und das maternale Gen bildet den dazugehörigen antagonistischen Mechanismus. Eine fehlerhafte Prägung würde die Embryonalentwicklung aus dem Gleichgewicht bringen (Reik et al., 1995; John und Surani, 2000).

Zur Steuerung und zum Zeitpunkt des „Imprinting“ weiß man bisher wenig. Vermutet wird, dass die Chromatinsubstitution in der männlichen Keimbahn eine spezielle Umprogrammierung des Genoms in der Oozyte vorbereitet, die wiederum hauptsächlich vom mütterlichen Erbgut abhängig ist. Unter der Chromatinsubstitution versteht man den Austausch der somatischen Histone gegen stärker basische chromosomale Proteine. Aus verschiedenen Gründen scheint die genetische Prägung eine wichtige Rolle in der Evolution der Säugetiere und des Menschen gespielt zu haben, z. B. als spezieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der geschlechtlichen Fortpflanzung (Kelley et al., 1988) oder bei der Entwicklung der Plazenta (Haig und Graham, 1991; John und Surani, 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen: Man spricht von einer genomischen Prägung, wenn die Allele der Mütter anders exprimiert werden als die Allele der Väter (Knippers, 1995). In einem „genomic imprinting“-Erbgang wird das betroffene Allel zwar nach den Mendel'schen Regeln vererbt, jedoch ist die Ausprägung des Merkmals vom jeweiligen Geschlecht abhängig, welches das Allel transmittiert hat. Barlow (1994) definiert die genomische Prägung als einen „reversibler Prozeß, bei dem in der Elterngeneration eine gameten-spezifische DNA-Modifikation stattfindet und es aufgrund dessen zu Funktionsunterschieden im maternalen und paternalen Genom der diploiden Nachkommenzellen kommt“.

## 1.5. Epidemiologie der Psoriasis vulgaris

### 1.5.1. Prävalenz der Psoriasis vulgaris

Die Prävalenz der Psoriasis vulgaris wird auf ~ 2 % bis 3 % geschätzt (Lomholt, 1963; Nevitt and Hutchinson, 1996; Plunkett und Marks, 1998). Tatsächlich variiert sie stark in Abhängigkeit von den Kontinenten und Populationen. Ein interessantes Beispiel für den Einfluss der ethnischen Herkunft zeigt sich in Australien: Plunkett und Marks (1998) berichten in ihrem australischen epidemiologischen „Review“, dass bei den australischen Ureinwohnern mit reiner Abstammung Psoriasis sehr selten oder gar nicht vorkommt, wohingegen die Prävalenz der Krankheit bei der weißen australischen Bevölkerung mit 2,6 % der Häufigkeit in den westlichen Ländern entspricht. Allgemein wird von einer höheren Frequenz der Krankheit in den Völkern der ehemaligen Sowjetunion und in Norwegen (5 – 10 %), von einer moderaten Prävalenz in Europa und den USA (2 – 3 %) und einer geringen Prävalenz bei den nordamerikanischen und lateinamerikanischen Indios, bei den Mongolen und in Westafrika (0 – 0,3 %) berichtet (Camp, 1992; Farber und Nall, 1994, Bhalerao und Bowcock, 1998). Die unterschiedlichen klimatischen Bedingungen und Lebensgewohnheiten in den einzelnen Ländern müssen als wichtige Einflußfaktoren für die Morbidität berücksichtigt werden. Der genetische Hintergrund scheint jedoch von überwiegender Bedeutung zu sein.

Hinsichtlich der Geschlechtsverteilung bei Psoriatikern fand Lomholt bei seinen Untersuchungen 1947/48 auf den Faröer Inseln in einem Kollektiv von 10.984 Personen ein etwas häufigeres Vorliegen der Erkrankung bei Männern (51 %) als bei Frauen (49 %) (Lomholt, 1963). In Übereinstimmung mit Beobachtungen von Brandrup und Green (1981) nehmen Swanbeck und Mitarbeiter (1994) an, dass Psoriasis etwas häufiger bei Männern als

bei Frauen vorkommt. Wenn ein Unterschied hinsichtlich der Geschlechtsverteilung vorhanden ist, erweist sich dieser jedoch als gering (Henseler, 1993).

Eine Studie über 36 Zwillingspaare in Dänemark ergab eine Konkordanz von Psoriasis bei 72 % der eineiigen Zwillingspaare, verglichen mit 15 % bei den zweieiigen Zwillingspaaren (Brandrup et al., 1978). Auch Faber und Mitarbeiter (1974) fanden eine im Vergleich wesentlich höhere Konkordanz-Rate bei den monozygoten Zwillingen. Außerdem fiel bei den eineiigen Geschwistern die Ähnlichkeit in der Verteilung der psoriatischen Hautläsionen am Körper auf. Es fand sich eine verblüffende Übereinstimmung in der Ausprägung der Krankheit und im „age of onset“. Diese Beobachtungen konnte man bei den zweieiigen Zwillingspaaren nicht machen (Farber et al., 1974). An der nicht hundertprozentigen Konkordanz-Rate bei den eineiigen Zwillingen erkennt man jedoch, dass die Psoriasis trotz der starken genetischen Prädisposition auch unter dem Einfluss äußerer Faktoren steht.

Für die genetische Beratung präsentierten Swanbeck und Mitarbeiter (1997) eine skandinavische Studie, die mit Hilfe der Daten von 3.095 Psoriatikern und ihren Familien erstellt wurde. Demnach liegt das lebenslange Erkrankungsrisiko für jemanden, dessen Eltern nicht von Psoriasis betroffen sind, bei ca. 4 Prozent. Wenn ein oder beide Eltern Psoriasis haben, beträgt die Wahrscheinlichkeit jedoch 28 bzw. 65 %. Wenn sich bereits ein betroffenes Kind in der Familie befindet, liegt das jeweilige Erkrankungs-Risiko für weitere Geschwister bei 24 %, wenn kein Elternteil Psoriasis hat, bei 51 % wenn Mutter oder Vater betroffen sind, bzw. bei 83 %, wenn beide Eltern Psoriasis haben. Bei deutschen Patienten sind die Risikoziffern deutlich niedriger und können in etwa halbiert werden (Andressen und Henseler, 1982).

### 1.5.2. Zusammenhänge mit anderen Krankheiten

Als bislang einzige nicht-kutane Manifestation der Psoriasis gilt die Psoriasis-Arthritis. Signifikant häufiger findet man bei Psoriasis-Patienten Krankheiten wie Bluthochdruck, Herzinsuffizienz, Adipositas sowie Diabetes mellitus (Christophers und Mrowietz, 1999). Die Assoziation von Psoriasis mit Morbus Crohn (Lee et al., 1990) hat durch die genetische Analyse der beiden Krankheiten eine gewisse Bestätigung bekommen, denn für beide existiert offenbar ein Suszeptibilitäts-Faktor auf Chromosom 16q (Nair et al., 1997) und Chromosom 19p (Lee et al., 2000). Auch existiert eine erhöhte Inzidenz der Psoriasis bei HIV positiven Patienten (Johnson, et al., 1985; Duvic et al., 1987). In einer Studie über 700 HIV-infizierte Patienten mit Hauterkrankungen wurde bei 5 % von ihnen eine Psoriasis diagnostiziert

(Normalbevölkerung ~ 2 %). Häufig erkrankten die Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium der HIV-Infektion, wenn das Verhältnis der CD<sub>4</sub><sup>+</sup> zu CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zellen unter den Wert von 0,4 sank (Wolfer et al., 1996). Interessanter Weise wirkt sich Cyclosporin A, das auch zur Therapie schwerer Psoriasis-Manifestationen eingesetzt wird, positiv auf die Verhinderung der Progression der HIV-Infektion aus (Levy et al., 1995).

Andererseits gibt es einige Krankheiten, die in negativer Assoziation zur Psoriasis stehen: Neurodermitis (atopisches Ekzem), exogen-allergisches Asthma und allergische Rhinokonjunktivitis - zusammengenommen das „atopische Syndrom“ - sind bei Psoriasis-Patienten selten anzutreffen (Christophers und Mrowietz, 1999). Pathogenetisch stellt sich der psoriatische Formenkreis, bei dem eine TH<sub>1</sub>-Immunantwort vorliegt (s. u.) gegenüber dem atopischen Syndrom, dem Musterbeispiel für eine TH<sub>2</sub>-medierte Entzündungsreaktion, als gegensätzlicher Krankheitstyp dar (Fritsch, 1997).

#### 1.6. Histologie der Psoriasis vulgaris

Zunächst sei die Histophysiologie einer gesunden Epidermis skizziert (Schiebler et al., 1986): Das auf der Basalmembran haftende Stratum basale stellt die Regenerationsschicht der sich „terminal differenzierenden“ Keratinozyten dar. Dabei ist zu beachten, dass die Basalmembran selbst eine Syntheseleistung der Keratinozyten darstellt. Die sich abflachenden Zellen des Stratum spinosum, das wegen seinen zur Zugfestigkeit der Epidermis stark beitragenden Zellausläufer (Desmosomen) auch „Stachelzellschicht“ genannt wird, sind ebenfalls noch vereinzelt mitotisch aktiv. Zahlreiche basophile Keratohyalin granula charakterisieren das sich anschließende Stratum granulosum. Im Stratum corneum kann in der dicken Epidermis (an Palmae u. Plantae) das schmale homogen eosinophile Band des Stratum lucidum von den oberen fest gepackten kernlosen Hornzellen unterschieden werden. Von der Flächenausdehnung her gesehen überdeckt eine Stratum-corneum-Zelle etwa 25 Zellen des Stratum basale. Die Regezeit der Epidermis beträgt normalerweise ungefähr 30 Tage, wobei die Mitoseaktivität der Keratinozyten durch ein kompliziertes Zusammenspiel mit dem Stratum papillare der Dermis gesteuert wird. In den Bindegewebszapfen befinden sich die für die Ernährung der Epidermis wichtigen Kapillarschleifen und Lymphozyten, die mit den suprabasal in der Epidermis liegenden Langerhanszellen in Kontakt treten können. Für den wichtigen Prozess der Induktion einer Immunantwort geht man allerdings davon aus, dass die Langerhanszellen das Antigen aufnehmen, dieses verarbeiten, sich dann aus der Haut



heraus in den zugehörigen Lymphknoten begeben und dort das prozessierte Antigen den T-Lymphozyten präsentieren.

Altman und Kamino (1999) stellen die histologisch-diagnostischen Kriterien zur Präsentation der chronischen Plaque-Psoriasis sehr differenziert zusammen: Kennzeichnend für alle Psoriasisformen sind die dilatierten und irregulär geschlungenen Kapillaren im Stratum papillare, deren Alteration auch in den abgeheilten Hautstellen erkennbar ist. Die Bindegewebszapfen des oedematösen Stratum papillare sind vergrößert und enthalten perivaskulär zahlreiche Rundzellularinfiltrate aus Lymphozyten ( $CD_4^+$  gegenüber  $CD_8^+$  vermehrt), Monozyten und später auch neutrophilen Zellen. Insgesamt herrscht eine epidermale Hyperplasie mit zahlreichen basalen Mitosefiguren und einer Verdickung des Stratum spinosum (Akanthose). Während die oberen Keratinozyten abgeblasst erscheinen und entgegen der Norm Zellkerne enthalten (Hyperparakeratose), ist das darunter liegende Stratum granulosum später u. U. völlig ausgedünnt (Hypogranulose).

Der Zellzyklus der hyperproliferativen psoriatischen Keratinozyten ist auf 1 – 5 Tage verkürzt, wobei die Reifung und Abstoßung der Hornlamelle innerhalb von 4 Tagen geschieht (Weinstein et al., 1987). Atypische Differenzierungsformen können jedoch nicht beobachtet werden.

Ein typisches histologisches Merkmal sind die sterilen „Munro-Mikroabszesse“, die durch Diapedese neutrophiler Granulozyten in parakeratotisch veränderte Epidermis-Schichten entstehen. Ohne die Munro-Mikroabszesse kann die histologische Diagnose für Psoriasis nicht sicher gestellt werden (Camisa, 1994). Die Produktion von Keratinen in psoriatischer Haut ist entgegen der Norm verändert (Wilson et al., 1994; u. a.).

## 1.7. Immunologie und Pathogenese der Psoriasis vulgaris

Die bisherige immundermatologische Forschung zeigt deutlich das komplexe Zusammenspiel der immunkompetenten Zellen, der Zytokine und einiger weiterer Mediatoren. Im Zentrum des Immunsystems stehen die T-Helfer-Zellen, die verschiedene Effekte wie die Induktion zytotoxischer  $CD_8^+$  T-Zellen, die die Bildung von Antikörpern durch die B-Zellen, die Aktivierung von Makrophagen oder die Degranulation von Mastzellen hervorrufen können. Die Steuerung dieser Reaktionen wird über die Expression und Sezernierung eines bestimmten Zytokin-Musters geregelt. Zytokine sind niedermolekulare Proteine, meist Glykoproteine, die als lösliche Botenstoffe von immunkompetenten Zellen

aber fast auch von allen anderen Zellen, wie z. B. den Keratinozyten oder Endothelien, gebildet werden können. Zu den Zytokinen gehören unter anderem die Interleukine, Tumornekrose-Faktoren, Wachstumsfaktoren und Interferone (Heilig et al., 1998). Inzwischen ist klar, dass sie im Rahmen der Pathogenese von Hautkrankheiten eine entscheidende Rolle spielen (Luger und Schwarz, 1993).

Im Gegensatz zum Hauptmechanismus in der Pathogenese von allergischen Hauterkrankungen ist die Psoriasis eher durch das Bild einer T-Helfer-Zellen-Reaktion vom Typ 1 (TH1-Reaktion) charakterisiert, denn in den psoriatischen Hautläsionen findet man vorrangig die Expression von IL-2 und Gamma-Interferon (IFN- $\gamma$ ) und weniger die von IL-4, IL-5 oder IL-10 (Ortonne, 1999; Nickoloff, Sept. 1999):

- Das von den T-Zellen stammende IL-2 ist für die Aktivierung und das Wachstum ihrer selbst zuständig (Synonym: TCGF).
- Gamma-Interferon ist höchstwahrscheinlich sehr bedeutend für die Attraktion der T-Lymphozyten in die Epidermis, indem es die Expression von ICAM-1 auf den Endothelzellen fördert (Griffiths et al., 1989). Im Gegensatz zum antiviral wirkenden Typ 1 Interferon (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) steht bei IFN- $\gamma$  die zelluläre und humorale Immunabwehr im Vordergrund. Es kommt zu einer effektiveren Antigen-Präsentation an die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen. Über Zytokine wird die Effizienz der Phagozytose der Makrophagen und der Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM auf IgG gefördert. Das bei Psoriatikern vermehrt erscheinende IFN- $\gamma$  (Barker et al, 1991) mag somit die Abwehr der Haut gegenüber Bakterien, Viren, Pilzen oder auch Neoplasien unterstützen.

Den starken Einfluss von IFN- $\gamma$  und IL-2 illustriert die Beobachtung, dass die Verabreichung dieser Zytokine im Rahmen einer anti-rheumatischen oder anti-neoplastischen Therapie zu einer deutlichen Verschlechterung einer präexistenten Psoriasis führt (O'Connell et al., 1992; Okanoue et al., 1994).

In auffälligem Kontrast zu anderen entzündlichen Hautkrankheiten ist die Psoriasis durch den beschleunigten „Turnover“ in der Epidermis gekennzeichnet, d. h. durch die schnellere Wanderung der Keratinozyten von der Basalzelle bis hin zur abschilfernden Hornschuppe (Valdimarsson et al., 1995; Nickoloff, Sept. 1999). Dieses epidermale Reaktionsmuster ist fast ausschließlich der Psoriasis eigen. Ein ähnliches Reaktionsmuster wird interessanter Weise bei einer seltenen monogen vererbten Hauterkrankung, der epidermolytischen

Hyperkeratose, als Folge von Mutationen in den Genen für Keratin 1 oder Keratin 10 gefunden (Rothnagel et al., 1992). Die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und Keratinozyten über Cytokine spielt bei der Psoriasis offenbar die Hauptrolle beim beschleunigten Umsatz der Keratinozyten (Baker und Fry, 1992).

Valdimarsson und Mitarbeiter (1986) veröffentlichten die Hypothese, dass aktivierte T-Zellen durch eine abnormale Antigen-Expression zusammen mit dendritischen Langerhanszellen in die unteren Schichten zwischen Dermis und Epidermis migrieren und dort eine Keratinozyten-Proliferation verursachen könnten. Besonders die Tatsache, dass sich eine Reihe immunsuppressiver Substanzen hervorragend zur Therapie der Psoriasis einsetzen lässt, hat das immunologische Konzept der Krankheit und die besondere Rolle der T-Lymphozyten unterstützt (Nickoloff, Sept. 1999). Beispielsweise war die Einführung von Cyclosporin ein Durchbruch für die Therapie schwerster Psoriasis-Formen (Ellis et al., 1986). Dessen immunsuppressive Wirkung kommt durch die hemmende Wirkung auf die lymphozytäre Produktion von IL-2 zustande. Es konnte jedoch keine Veränderungen der Aktivität der Keratinozyten beobachtet werden (Gottlieb et al., 1992).

Ein weiteres immunsuppressiv wirkendes Medikament zur Behandlung der Psoriasis stellt Fumarsäure-Ester („Fumaderm“) dar (Altmeyer, 1996). Der Wirkmechanismus scheint insbesondere auf einer Stimulation der IL-10-Sekretion zu basieren, die zu einer Suppression des TH1-Cytokin-Musters der Psoriasis mit beiträgt (Ockenfels et al., 1998).

Den Einfluss von IL-2 auf das Krankheitsgeschehen und damit indirekt auch auf den Wirkmechanismus von Cyclosporin illustriert ein weiterer immunsuppressiver Ansatz: In einer therapeutischen Studie gab man einer Patienten-Gruppe von 10 Personen das IL-2-Lymphozyten-Toxin DAB389, ein Konjugat aus Diphtherie-Toxin und IL-2, das selektiv aktive Lymphozyten aber nicht die Keratinozyten blockt. Nach zwei niedrig dosierten Zyklen zeigten vier Patienten eine starke und weitere vier eine moderate Verbesserung des Krankheitsbildes (Gottlieb et al., 1995).

Mit Beginn der 90-er Jahre wurden zur Erforschung der Psoriasis auch Experimente an Tiermodellen hinzugezogen (Bhalerao und Bowcock, 1998). Ein Vorgehen bestand darin, symptomlose Haut von Psoriasis-Patienten (PN) und Haut von gesunden Probanden (NN) auf SCID-Mäuse, d. h. auf Mäuse mit schwerem Immundefekt, zu verpflanzen, diesen dann Immunzellen in die Dermis zu injizieren und den resultierenden Phänotyp histologisch-klinisch zu untersuchen. So bewiesen einige Versuche, dass es den T-Lymphozyten möglich ist, an symptomloser Haut eine Konversion in psoriatische Plaques hervorzurufen.

Letztendlich zeigte aber nur die PN-Haut eine psoriatische Transformation (Wrone-Smith und Nickoloff, 1996; Nickoloff und Wrone-Smith, 1999).

Skov und Mitarbeiter (1997) konnten in einem In-vitro-Experiment zeigen, dass auf den psoriatischen Keratinozyten scheinbar eine Überexprimierung des T-Zell-aktivierenden Moleküls CDw60 stattfand, wenn man zuvor aktivierte T-Zellen aus läsionaler Psoriasis-Haut mit den Keratinozyten in Kontakt treten ließ.

All diese Beobachtungen und Versuche stellten einen Beweis für die maßgebliche Involvierung der T-Zellen in die Pathogenese der Psoriasis dar.

Das Zytokin-Muster, das bei der Aktivierung der Keratinozyten eine Rolle spielt, ist inzwischen recht gut erforscht. Dabei sezernieren auch die Keratinozyten einen großen Anteil der Botenstoffe, die multiple Effekte auf sie selbst und auf andere Zelltypen einschließlich der T-Lymphozyten haben. Zu den Zytokinen gehören die Interleukine IL-1, IL-6 und IL-8, der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der *transforming growth factor* (TGF- $\alpha$ ) und wiederum IFN- $\gamma$  (Baker und Frey, 1992; Ortonne, 1999):

- IL-1 und TNF- $\alpha$  wird außer von den Keratinozyten auch von antigenpräsentierenden Zellen produziert. Wie das bereits beschriebene IFN- $\gamma$  veranlassen die beiden zentralen Botenstoffe IL-1 und TNF- $\alpha$  die Expression wichtiger Zelladhäsionsmoleküle. Dazu zählen das ELAM-1 auf den Endothelzellen, das VCAM-1 (vascular cell adhesion moleküle), das komplementär mit VLA-4 (very late antigen) wirkt, und das ICAM-1, das über die Interaktion mit dem LFA-1 (leukocyte function-associated antigen) die Infiltration der Leukozyten fördert (Griffiths, et al.1989; Baker und Frey, 1992; Ortonne, 1999). Paukkonen und Mitarbeiter (1995) konnten mit einer Untersuchung an 36 psoriatischen Patienten nachweisen, dass das Erscheinen von ICAM-1 auf den Keratinozyten mit der Manifestation der psoriatischen Läsionen einhergeht.
- Die beiden Interleukine IL-6 und IL-8 fördern die Aktivierung, Proliferation und Chemotaxis der T-Lymphozyten und damit deren Infiltration in die Dermis. IL-6 wird sowohl von den Keratinozyten als auch Leukozyten gebildet. Die Untersuchungen von Grossman und Mitarbeitern (1991) zeigten, dass IL-6 im Plasma von Patienten mit aktiver Psoriasis deutlich erhöht ist und dass dieses Interleukin direkt zur Proliferation von normalen Keratinozyten beitragen kann. Auch das „releasing“ von IL-8 stimuliert das Wachstum der Keratinozyten (Baker und Frey, 1992). IL-8 ist zudem ein herausragender Faktor bei der Granulozyten- und Monozytenaktivierung (Holmes et al., 1991), der bei der

Entstehung der charakteristischen psoriatischen Mikroabszesse entscheidend mitverantwortlich sein könnte.

- Der von den Keratinozyten gebildete TGF- $\alpha$  (transforming growth factor) wirkt auf diese selbst und zeigt eine Induzierbarkeit durch TNF- $\alpha$  (Baker und Frey, 1992).

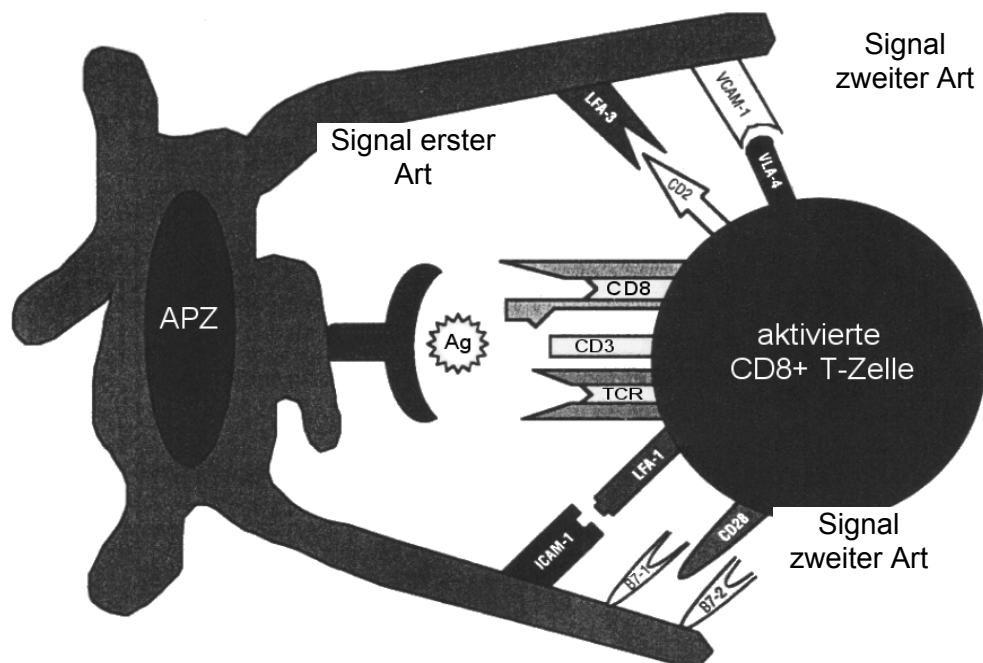
Im Zusammenspiel des psoriatischen Zytokin-Musters scheint neben diesen inflammatorischen Substanzen auch das System der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) von Einfluss zu sein. Im Experiment mit transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass der von den Keratinozyten vermehrt gebildete „*epidermal growth factor*“ Amphiregulin histologisch eine psoriasiforme Hautläsionen hervorruft (Cook et al., 1997).

Die Zytokin-Phänomene der Psoriasis befinden sich im Einklang mit dem Wirken „einer der ältesten antipsoriatischen Lokalthérapien“ (Fritsch, 1997), der Behandlung durch Dithranol. So stellte man bei 27 Psoriasis-Patienten fest, dass es bei ihnen im Blut im Vergleich der Plasma-Konzentrationen vor und nach der Behandlung mit Dithranol zu einem deutlichen Rückgang der IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Spiegel kam (Chodorowska, 1998).

In der zentralen Frage nach dem Auslöser der Immunaktivierung analysierte man bereits frühzeitig das Verhältnis zwischen den CD<sub>4</sub><sup>+</sup> und CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Lymphozyten. Seit langem ist aus longitudinalen Studien bei der Psoriasis guttata bekannt, dass die Eruption mit dem epidermalen Einstrom und der Aktivierung von CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Zellen einhergeht und dass das Abklingen des akuten Schubs mit einem Anstieg der CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zellen assoziiert ist (Baker et al., 1984). Im Versuch von Nickoloff und Wrono-Smith (1999) zeigte die Injizierung von CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zellen in die Dermis von SCID-Mäusen im Gegensatz zur Injizierung der autologen aktivierten CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Zellen kein Auftreten von psoriatischen Plaques. Nickoloff (Sept. 1999) schlussfolgerte daraus, dass CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Zellen mit ihrem vermehrten Erscheinen in der Dermis ein Mikromilieu erzeugten, das die bereits vorher intraepidermal vorhandenen CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zellen „aufwecken könnte“. Bei diesem Vorgang sei jedoch noch ein weiteres Hilfssignal von den CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Zellen an die CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zellen notwendig, dessen Natur kürzlich von Tumor-Immunologen entschlüsselt wurde (Lanzavecchia, 1998). Demnach käme es über die Interaktion der antigenpräsentierenden Zellen zu einer CD<sub>4</sub><sup>+</sup>  $\rightarrow$  APZ  $\rightarrow$  CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Kommunikation, welche die CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zellen dazu aktivieren könne, beispielsweise Tumorzellen anzugreifen und zu zerstören. Hierbei interagiert offenbar der CD-40L-Rezeptor der CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Zellen mit dem APZ-Rezeptor CD-40.

Zu den antigenpräsentierenden Zellen, die ein zentrales Element in der Immunantwort der Haut darstellen, gehören die Langerhans-Zellen und Makrophagen, die den CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T-Zellen

fremde Antigene über die MHC Klasse II präsentieren, den CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T-Zellen körpereigene, bakterielle oder virale Peptide jedoch über die MHC Klasse I darbieten (Heilig et al., 1998). Bei der Aktivierung der CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zellen durch die APZ gibt es einige weitere Liganden-Rezeptoren-Paare (s. Abb. 1.1.). Neben der Antigenerkennung durch das *Signal erster Art* ist zur kompletten CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zell-Aktivierung, wie sie bei der Psoriasis vorstellbar ist, ein *Signal zweiter Art* notwendig, bei dem mehrere Zelloberflächen-Moleküle eine Rolle spielen (Nickoloff, Sept. 1999). Von besonderer Bedeutung scheint das Paar B7/CD-28 zu sein. Ein Fusionsprotein (CTLA4Ig), das die Rezeptoren CD-28 und CD-152 blockiert, hat in der experimentellen Behandlung von 43 Patienten mit chronisch stabiler Psoriasis vulgaris bei 46 % eine deutliche Besserung des klinischen Bildes gezeigt (Abrams et al., 1999).



	APZ		CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> Zellen	
Signal erster Art:	MHC Klasse 1	↔ + Antigen ?	↔	TCR/CD-3/CD-8-Komplex
Signale zweiter Art:	LFA-3	↔		CD-2
	VCAM-1	↔		VLA-4
	ICAM-1	↔		LFA-1
	B7-1 und B7-2	↔		CD-28

Abb. 1.1.: Liganden-Rezeptor-Beziehungen zwischen antigenpräsentierender Zelle und aktivierter CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zelle. Erklärung siehe Text. (Abbildung nach Nickoloff, Sept. 1999).

Zwar ist man sich im Allgemeinen darüber einig, dass die aktivierten T-Lymphozyten einen Hauptfaktor bei der Krankheitsentstehung der Psoriasis darstellen, bislang ist aber noch nicht sicher, welche Substanz (oder welche Substanzen) den ursächlichen Triggerfaktor für die T-Lymphozyten darstellt und das chronische „waxing and waning“ (Krueger und Duvic, 1994) der Psoriasis bedingt.

Studien bei der Psoriasis guttata deuteten an, dass es möglicher Weise ein Superantigen für eine polyklonale T-Zellvermehrung gibt. So könnte Psoriasis als Autoimmunkrankheit aufgefasst werden, die durch einen bestimmten Streptokokken-Serotyp induziert und durch die *Kreuzreaktion* eines M-Proteins mit einem epidermalen Keratin der Psoriasis-Patienten aufrecht erhalten wird (McFadden et al., 1991; Valdimarsson et al., 1995 und 1997). In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise auf strukturelle und immunologische Ähnlichkeiten von rekombinant hergestellten M6-Peptiden der Streptokokken und bestimmten epidermalen Keratinen (Sigmundsdottir et al., 1997).

Abgesehen von den bakteriellen Superantigenen oder einfachen Antigenen wurden eine Reihe weiterer „Kandidaten“ für die T-Zell-Aktivierung bei der Psoriasis verdächtigt. Zu diesen zählt das Neuropeptid Substanz P (Naukarinen et al., 1989) oder das Humane Papilloma Virus (Favre et al., 1998). Im Blutserum von Psoriatikern wurde eine signifikant höhere Prävalenz von Antikörpern gegen HPV-5-ähnliche Partikel gemessen als bei den Kontrollgruppen. HPV-Viren sind mit der sehr seltenen Epidermodysplasia verruciformis assoziiert, die wie die Psoriasis vulgaris einen genetischen Suszeptibilitäts-Ort auf Chromosom 17q aufweist (Tomfohrde et al., 1994; Ramoz et al., 1999).

Trotz der vielen unterschiedlichen Untersuchungen konnte bislang für keine Substanz bewiesen werden, dass sie über den Weg der T-Zell-Aktivierung die primäre Ursache der Psoriasis darstellt.

Nickoloff und Mitarbeiter (Mai 1999) und Nickoloff (Sept. 1999) schlagen ein neues immunologisches Modell vor, das die Frage nach dem vermeintlichen „Autoantigen“ usw. umgeht. Die bisherigen Betrachtungen bezogen sich auf die *erworbene Immunabwehr* (dem Zusammenspiel von MHC-Klasse-II-Molekülen, T-Zell-Rezeptor, CD<sub>8</sub>-/CD<sub>4</sub>-Zellen und bestimmten Antigenen). Andererseits könnte die Aktivierung der T-Lymphozyten auch über das *angeborene Immunsystem* ablaufen. Die Experimente von Nickoloff und Mitarbeiter (Mai 1999) ergaben Hinweise auf die Involvierung von *NK-Zellen* (natural killer cells) bei der Psoriasis. Diese besitzen Rezeptoren wie CD158a p50, CD158b p50 oder CD161, die die HLA-I-Moleküle Cw1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 und verschiedene andere Zelloberflächen-Rezeptoren auf den Keratinozyten erkennen können. Zu diesen alternativen

Erkennungsmolekülen der Zellmembran gehört u. a. das nicht-klassische HLA-ähnliche Antigen CD1d, dessen Gen auf Chromosom 1 liegt, und das polymorphe MICA-Antigen, das wie die HLA-Ketten auf Chromosom 6 kodiert wird. Durch diese alternativen Liganden/Rezeptor-Beziehungen werden NK-Zellen aktiviert oder deaktiviert (s. Abb. 1.2.; Nickoloff, Sept. 1999). Bonish und Mitarbeiter (2000) zeigten, dass der CD1d-Rezeptor auf den Keratinozyten bei Psoriasis und anderen inflammatorischen Hauterkrankungen wahrscheinlich hochreguliert ist. Weitere Experimente lassen vermuten, dass es über die NK-Zellen und CD1d-positiven Keratinozyten zu einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Produktion kommt - und somit zu einer TH1-Immunantwort, die für die Psoriasis typisch ist (Nickoloff et al., Dez. 2000).

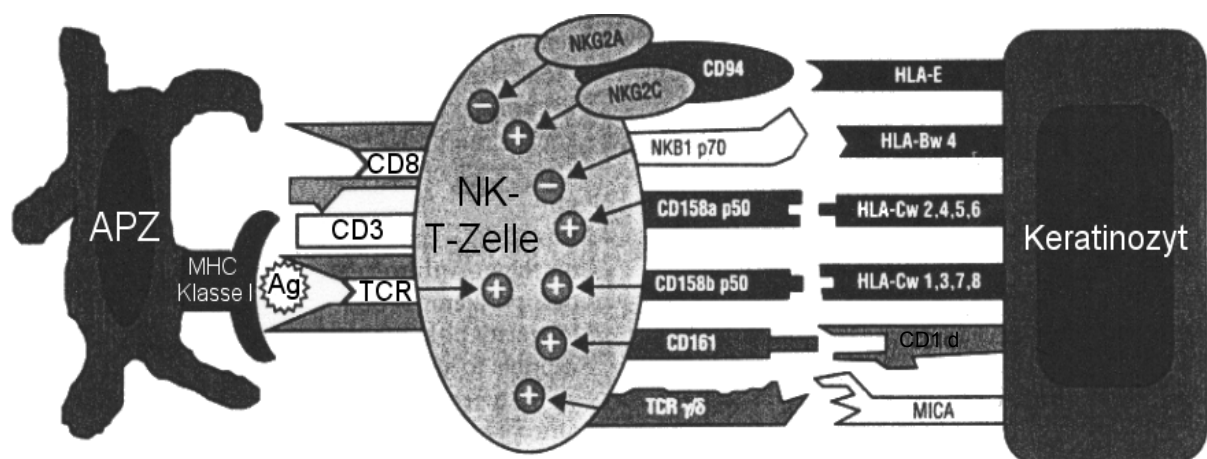


Abb. 1.2.: Die Aktivierung der NK-T-Zellen kann durch den T-Zellrezeptor-Mechanismus der MHC-Klasse I (linke Seite) oder über einige andere Liganden/Rezeptor-Beziehungen (rechte Seite) stattfinden (Darstellung nach Nickoloff, Sept. 1999).

An den oben dargestellten Forschungsergebnissen erkennt man, dass sich bisher nicht genau sagen lässt, ob der „Hauptübeltäter“ (Nickoloff, Sept. 1999) für die Psoriasis primär bei den T-Lymphozyten oder bei den Keratinozyten, Endothelzellen oder Fibroblasten „sitzt“.

Kadunce und Krueger (1995) unterstützen die „framework hypothesis“ und schlagen vor, dass der primäre Defekt allein bei den Keratinozyten oder Fibroblasten zu suchen sei. Der einzigartige pathologische Mechanismus bei der Psoriasis bestünde aus der angeborenen, übermäßigen Proliferationsaktivität und veränderten Differenzierung der Keratinozyten. Da Proliferation und Differenzierung zum großen Teil genetisch festgelegt seien, sollte man deshalb verstärkt nach genetischen Veränderungen, d. h. Mutationen von Transkriptions- bzw.



Translationsfaktoren, von Cytokinen oder Wachstumsfaktoren suchen. Die nicht 100 %-ige Penetranz der Psoriasis könnte gut durch einen grundlegenden Defekt eines Rezeptor/Liganden-Komplex erklärt werden, da es bei derartigen Störung häufig zu Schwelleneffekten kommt.

Wrone-Smith und Mitarbeiter (1997) stellten fest, dass Keratinozyten aus psoriatischen Läsionen gegenüber Apoptose resistenter sind als Normalhaut-Keratinozyten. In einer jüngeren Untersuchung wird davon gesprochen, dass sich die Keratinozyten von Psoriasis-Patienten teilweise wie „senescent cells“ verhalten würden, d. h. wie Zellen in einem vorgealterten Zustand (Chaturvedi et al., 1999). Damit wäre die erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose und die trotz der erhöhten Proliferationsrate verhältnismäßig seltene maligne Transformation in ein Plattenepithel-Karzinom erklärbar (Nickoloff, Sept. 1999; Lindelof et al., 1990).

Eine beeindruckende Arbeit, die stark die Meinung unterstützt, dass sich ein Primärdefekt der Psoriasis in den Keratinozyten befindet, lieferten Carroll und Mitarbeiter (1995). Über die Kopplung humaner Integrin-Gene an die Involucrin-Promoter-Region der Maus konstruierten sie ein transgenes Mausmodell, an dem sie nachwiesen, dass die suprabasale epidermale Expression des Integrin  $\beta_1$  allein oder in Kombination mit den Integrinen  $\alpha_2$  und  $\alpha_5$  mit einem Phänotyp der Haut einhergeht, der der humanen Plaque-Psoriasis sehr ähnlich ist. In der Histologie der Mäusehaut sah man eine typische epidermale Hyperplasie, dilatierte Kapillaren, eine Akanthose und Hypogranulose, Hyperkeratosen und je nach Region Ortho- und Parakeratosen. Auch das charakteristische Infiltrat der  $CD_4^+/CD_8^+$  Zellen und eine erhöhte ICAM-1 Expression war vorhanden. Carroll und Mitarbeiter (1995) zeigten, dass diese Psoriasis-typischen Veränderungen allein durch die unterschiedliche Integrin-Expression in der Epidermis hervorgerufen wurden. Die Autoren vermuteten, dass bestimmte Integrin-Muster eine aberrante epidermale Proliferation und Differenzierung hervorriefen. Die Keratinozyten lösten dann sekundär durch die Aussendung von Cytokinen eine Entzündungsreaktion aus (Carroll et al., 1995).

Hertle und Mitarbeiter (1995) machten Experimente, bei denen sie die Cytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , die in psoriatischer Haut vermehrt vorkommen (s. o.), in die Haut von Testpersonen injizierten. Aus den Ergebnissen schlussfolgerten sie, dass die Integrin-Expression nicht von TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  beeinflusst wird. Wie z. B. bei der Wundheilung zeigten die jeweiligen Integrinmuster vielmehr einen veränderten Proliferations- und Differenzierungszustand der Epidermis an. Wie Carroll und Mitarbeiter (1995) hielten Hertle und Mitarbeiter (1995) das Entzündungsgeschehen bei der Psoriasis für eine sekundär in Erscheinung tretende Reaktion.

Die kontroversen Debatten bei der Erforschung der Psoriasis haben zu zahlreichen neuen Erkenntnissen über die Vorgänge in der Haut geführt, beispielsweise über das empfindliche cytokingesteuerte Proliferationsgleichgewicht der Epidermis. Umgekehrt spiegeln die Konzepte zur Pathogenese der Psoriasis die gerade aktuellen Meinungen in der kutanen Biologie wider. Bisher ist die Frage nicht beantwortet, ob die Psoriasis als Autoimmunkrankheit aufzufassen ist, bei der fehlgeleitete T-Zellen sekundär eine abnormale Reaktion der Keratinozyten auslösen, oder ob es sich vielmehr um einen angeborenen Defekt im epidermalen Antwortschema auf infektiöse und/oder physiko/chemikalische Reize handelt (Nickoloff, Schröder et al., 2000). Es ist ebenfalls vorstellbar, dass beides - eine bestimmte angeborene epidermale Reaktionsbereitschaft und eine fehlgeleitete T-Zell-Immunantwort - erforderlich ist, um eine Psoriasis vulgaris auszulösen.

## 1.8. Die Genetik der Psoriasis vulgaris

Anhand vielfältiger epidemiologischer Untersuchungen (Lomholt, 1963; Farber et al., 1974, u. a.) und an der Assoziation der Psoriasis vulgaris mit den HLA-Antigenen (Brenner et al., 1978; u.a.) erkannte man frühzeitig die starke genetische Determinierung der Krankheit.

### 1.8.1. Vererbungsmodus und Hinweise auf einen paternalen Effekt

Bis heute ist man sich nicht darüber einig, welches Vererbungsmodell der Psoriasis vulgaris definitiv zuzuordnen ist. Zum einen wurde früher häufig die Meinung vertreten, es handle sich um einen autosomal dominanten Erbgang mit reduzierter Penetranz (Abele et al., 1963; u.a.) oder um einen autosomal rezessiven Erbgang mit hoher Allel-Frequenz (Swanbeck et al., 1994; u.a.). Ein dominantes Modell schlug bereits Romanus (1945) vor. Abele und Mitarbeiter (1963) schätzten die Penetranz des dominant vererbten Gens auf 60 %. Ihre Studie basierte auf den Befragungen und klinischen Untersuchungen einer Bevölkerungsstichprobe aus North Carolina. Swanbeck und Mitarbeiter (1994) zeigten in einer populationsgenetischen Studie, dass ein rezessives Vererbungsmodell am besten mit der Krankheitsverteilung in Psoriasis-Familien übereinstimmen würde. Bei einer hohen Genfrequenz sei in vielen Stammbäumen ein pseudodominanter Erbgang zu beobachten (Swanbeck et al., 1994).

Inzwischen gehen – insbesondere aufgrund der molekularen Daten (Kopplungsanalysen) - sämtliche auf dem Gebiet aktiv forschenden Gruppen davon aus, dass mehrere

unterschiedliche Gene die Psoriasis verursachen, d. h. dass die Krankheit polygen und zugleich heterogen ist (Lee et al., 2000; u. a.). Zu diesem Schluss kam Lomholt (1963) bei seiner groß angelegten Studie auf den Faröer Inseln. Elder und Mitarbeiter (1994) favorisieren aufgrund ihrer Untersuchungen das Multilokus-Modell: Es gebe eine limitierte Zahl von Hauptgenen, die zusammen mit dem HLA-Typ an der Krankheitsentstehung der Psoriasis vulgaris beteiligt seien.

Als weiterer Einblick in die komplexe Vererbung von Psoriasis kann die Untersuchungen von Happle (1991), Traupe und Mitarbeitern (1992) und Zachos und Mitarbeitern (1998) angesehen werden:

Happle (1991) kommentierte den seltenen Fall einer linearen Psoriasis und vermutete, dass die unregelmäßige Manifestation der Krankheit durch eine somatische Rekombination in der Haut im Zusammenhang mit anderen prädisponierenden Genen und Umweltfaktoren erzeugt werden kann. Er schlug vor, dass ein somatisches Crossing-Over in der frühen Entwicklung einer Tochterzelle zur Homozygotie eines Psoriasis-Gens und folglich zu einem Klon alterierter Stammzellen führen könnte.

Zu dieser Vorstellung passt die experimentelle Arbeit von Zachos und Mitarbeitern (1998), die bei der Analyse von chronischen Psoriasis-Plaques einen Hinweis dafür fanden, dass der Verlust an Heterozygotie (LOH ~ loss of heterozygosity) in den Keratinozyten ein wichtiges Phänomen bei der Entstehung von Psoriasis darstellen kann. Sie untersuchten sie 14 Patienten mit 11 Mikrosatelliten-Markern und fanden einen LOH wenigstens bei einem der getesteten Mikrosatelliten bei 9 von 14 Patienten, mit anderen Worten bei 64 % der Patienten. Ob dieser Befund in einer Folgestudie bestätigt werden kann, bleibt abzuwarten.

Traupe und Mitarbeiter (1992) fanden in ihrer Studie heraus, dass das Geburtsgewicht der Kinder von Psoriatikern signifikant höher lag, wenn der Vater betroffen war. Gleichzeitig zeigten sie anhand einer Nachuntersuchungen der Daten von den Faröer Inseln (Lomholt, 1963), dass eine höhere Penetranz der Krankheit vorlag, wenn der Vater erkrankt oder angenommener Genträger war. Konkret hatten in den Lomholt'schen Familien-Stammbäumen (1963) die psoriatischen Väter mit 28,4 % öfter ein ebenfalls betroffenes Kind als die Mütter mit Psoriasis (20,8 %). Dieser Unterschied ist signifikant ( $P = 0,015$ ). Diese Beobachtungen sprechen für das Vorliegen eines oder mehrerer Gene, die einer „genomischen Prägung“ unterliegen (s. Kap. 1.4.3.). Traupe und Mitarbeiter (1992) nennen im Diskussionsteil ihrer Arbeit einige Einflüsse, die eine genomische Prägung auf die Krankheitsaktivität der Psoriasis haben könnte. Diese Form der epigenetischen Modifikation, d. h. diese Art und Weise, die Transkriptionsrate von Genen zu kontrollieren, könnte

beispielsweise zu einer Reaktivierung einer stillen Gen-Mutation oder zu einer Repression einer aktiven Mutation führen. Das „genomic imprinting“ würde im ersten Fall die klinische Manifestation der Psoriasis fördern und im zweiten Fall unterdrücken.

Der Hinweis auf einen paternalen Effekt bei der Psoriasis wurde in den Jahren darauf in verschiedenen anderen Studien bestätigt. So berichten Rahman und Mitarbeiter (1999) von einer verstärkt paternal vererbten psoriatischen Arthropathie. Sie untersuchten 95 zufällig ausgewählte Probanden, die in einer kanadischen Psoriasis-Arthritis-Klinik behandelt wurden und deren Eltern ebenfalls eine kutane oder arthropathische Manifestation der Psoriasis aufwiesen. 62 Probanden (65 %) hatten einen betroffenen Vater, aber nur 33 Probanden (35 %) eine betroffene Mutter. Dieser Unterschied war signifikant ( $P = 0,001$ ). In der allgemeinen Patientenstichprobe wurden ebenfalls die Kinder der Probanden registriert. Eine psoriatische Manifestation bei den Nachkommen von betroffenen Vätern fand man bei 11 von 74 Nachkommen. Bei den Nachkommen der betroffenen Müttern ergab sich ein Verhältnis von 9 zu 108. Vielleicht aufgrund der nicht ausreichenden Anzahl der untersuchten Personen fehlte es hier an statistischer Signifikanz ( $P = 0,10$ ) für den paternalen Effekt. Interessanter Weise ergaben die Daten von Rahman und Mitarbeitern (1999) einen leichten Trend zu einer häufigeren Vater-zu-Sohn- als Vater-zu-Tochter-Vererbung (53 % versus 47 %) und zu einer parallel häufigeren Mutter-zu-Tochter- als Mutter-zu-Sohn-Vererbung (55 % versus 45 %).

Erwähnenswert ist, dass in anderen großen populationsgenetischen Studien über die Psoriasis vulgaris deutliche Hinweise auf einen paternalen Effekt gesehen werden können, ohne dass diese Auffälligkeiten in den Untersuchungen selbst in Richtung dieses Effekts interpretiert wurden. Auf den paternalen Effekt in den Lomholt'schen Daten (1963) haben Traupe und Mitarbeiter (1992) hingewiesen. Analysiert man die Arbeit von Farber und Nall (1974), findet man anhand einer Tabelle über die Häufigkeit der Psoriasis bei den Angehörigen ersten Grades von Psoriatikern heraus, dass von insgesamt 867 betroffenen Eltern nur 395 Mütter aber 472 Väter ein Kind mit Psoriasis hatten. So gesehen ist die Abweichung von der 50%-Verteilung signifikant ( $p \sim 0,01$ ; unter Vorbehalt, da die Definition der Indexperson nicht bekannt ist). Farber und Nall (1974) machen in ihrer Arbeit nicht auf diesen Unterschied aufmerksam. In einer jüngeren epidemiologischen Untersuchung von Swanbeck und Mitarbeitern (1994), die auf der Auswertung von Fragebögen basierte, findet man Angaben darüber, wie viele Psoriatiker der Stichprobe ebenfalls einen betroffenen Vater oder eine betroffene Mutter hatten und bei wie vielen Probanden beide Eltern betroffen waren oder kein Elternteil. Rechnet man die Zahlen für männliche und weibliche Probanden aus beiden Altersgruppen (Erkrankungsalter vor und nach dem 40. Lebensjahr) zusammen,

zeigt sich, dass 985 Probanden einen Vater mit Psoriasis hatten. Dagegen gaben aber nur 754 Probanden an, dass ihre Mutter die Krankheit hatte oder gehabt hatte.

Die in den oben erwähnten Studien (Lomholt, 1963; Farber und Nall, 1974; Swanbeck et al., 1994) erkennbaren deutlichen Hinweise auf einen paternalen Effekt bemerken auch Burden und Mitarbeiter (1998). Selbst wenn die einzelnen Analysen nicht immer signifikante Ergebnisse erzielen, sei doch die regelmäßige Tendenz zur bevorzugten väterlichen Vererbung ein sehr bemerkenswertes Zeichen. Burden und Mitarbeiter (1998) untersuchten in einer parametrischen und nicht-parametrischen Kopplungsanalyse einige genetische Marker auf Chromosom 4q, 6p und 17q (Kap. 1.8.3.). Dabei stellten sie neben der Kopplung der Marker D6S273, D6S291 und D6S426 von Chromosom 6 fest, dass deren Allele bei den Geschwistern mit Psoriasis deutlich häufiger gemeinsam vorkamen, wenn die Marker-Allele väterlichen Ursprungs waren (paternale Allele:  $P = 0,00083$ ;  $0,021$  bzw.  $0,067$ ) als wenn sie von der Mutter stammten (maternale Allele:  $P = 0,5$ ;  $0,5$  bzw.  $0,28$ ). Von den 764 Individuen hatten nach den Angaben in den Teilnahmefragebögen 13 % einen betroffenen Vater und 11 % eine betroffene Mutter ( $P = 0,044$ ). Das mittlere Erkrankungsalter der Väter lag durchschnittlich 24,1 Jahre über dem Erkrankungsalter der Kinder, während dieser Unterschied bei den Müttern nur 10,9 Jahre betrug ( $P = 0,009$ ; bei insgesamt 61 Eltern-Kind-Paaren mit Psoriasis vulgaris). Burden und Mitarbeiter (1998) vermuteten, dass sich auf Chromosom 6 ein paternal vererbtes Gen für die Psoriasis vulgaris befindet.

#### ÜBERSICHT

Autoren, die auf einen paternalen Effekt bei der Psoriasis hinweisen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Traupe et al., 1992</li> <li>- Burden et al., 1998</li> <li>- Rahman et al., 1999</li> <li>- Karason et al., 2003 (neu)</li> </ul>
Studien, in deren Daten sich deutliche oder eindeutige Hinweise auf einen paternalen Effekt befinden:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lomholt, 1963</li> <li>- Farber und Nall, 1974</li> <li>- Swanbeck et al., 1994</li> </ul>

Tab. 1.2.: Übersicht zu den bisherigen Beschreibungen eines paternalen Effekts bei der Psoriasis.

## 1.8.2. HLA-Assoziation und Psoriasis Typ 1 & 2

Russell und Mitarbeiter (1972) erbrachten erstmals den Nachweis, dass bestimmte HLA-Antigene überzufällig häufig bei Patienten mit Psoriasis vorkommen. Hierbei handelt es sich um Moleküle des sogenannten Major-Histokompatibilitäts-Komplexes (MHC) oder auch „human leukocyte antigen“-Komplex (HLA-Komplex), die auf der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen (Ausnahme: Erythrozyten und Trophoblasten) exprimiert werden und im Rahmen der Immunantwort eine wesentliche Rolle spielen (Heilig et al., 1998). Die Gene für den MHC liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, wobei die Klasse I die Loci HLA-A, HLA-B und HLA-C umfasst. Die Klasse-II-Antigene werden in der HLA-D-Region mit den zumindest drei Subregionen HLA-DP, -DQ und -DR codiert. Der französische Hämatologe Dausset (1958) beschrieb als erster ein MHC-Antigen, welches heute HLA A2 genannt wird.

Für die Psoriasis fanden Russell und Mitarbeiter in Finnland (1972), dass HLA-B 13 der MHC Klasse I bei 12 von 44 nicht-verwandten Psoriatikern vorhanden war und bei den Kontrollpersonen nur bei 3 von 89. Eine dem HLA-B-Lokus gegenüber noch stärkere Psoriasis-Assoziation wiesen dann Tiilikainen und Mitarbeiter (1980) mit HLA-Cw6 nach. Diese wichtige HLA-Cw6-Assoziation wurde von Henseler und Christophers (1985) bestätigt, die in ihrer Arbeit vor allen Dingen die These einer bimodalen Krankheitsverteilung der Psoriasis (Gunawardena et al., 1978) unterstützten. Sie analysierten des Erkrankungsalters von 2.147 Betroffenen und wiesen zwei Häufigkeitsgipfel mit jeweils unterschiedlichen HLA-Assoziationen nach: Von den Patienten, die vor dem vierzigsten Lebensjahr erkrankten, waren 85 % Cw6-positiv, im Gegensatz zu 15 % der Psoriatiker mit spätem Krankheitsbeginn (> 40 a). Schon Tiilikainen und Mitarbeiter (1980) hatten bemerkt, dass die HLA-Cw6-Assoziation bevorzugt bei der Psoriasis guttata zu finden ist, die ja häufig als Erstmanifestation in jungen Jahren in Folge einer Streptokokkeninfektion auftritt. Zugleich boten über 50 % der Patienten mit frühem Erkrankungsalter eine positive Familienanamnese bezüglich eines Elternteils, während bei den Psoriatikern mit später Manifestation nie ein Elternteil betroffen war (Tab. 1.3.).

Auffällig war beim Psoriasis-Frühtyp, dass das „age of onset“ der Männer durchschnittlich 6 Jahre höher lag als bei den Frauen. Die Probanden mit einem „early age of onset“ (< 40 a) zeigen überdurchschnittlich häufig das Antigen DR7 aus der HLA-Klasse II (Christophers und Henseler, 1989), sowie die HLA-Klasse-I-Antigene B13 und Bw57 (Brenner et al., 1978; Henseler und Christophers, 1985), während Patienten mit „late onset“ (> 40 a) öfters die

Antigene HLA Cw2 und B27 (Henseler und Christopher, 1985) aufweisen. Bei Psoriatikern mit Gelenkbeteiligung konnte in 50 % der Fälle HLA B27 nachgewiesen werden (Metzger et al., 1975), während bei Patienten mit Psoriasis pustulosa keine signifikante Assoziation zu den HLA-Antigenen HLA B13 und BW 17 gefunden wurde (Svejegaard et al., 1974; Ward et al., 1978).

Die Psoriasis-HLA-Assoziationen unterschiedlicher Populationen weichen unter Umständen beträchtlich voneinander ab. So sind in Japan nur 10 % der Betroffenen HLA-Cw6-positiv, während HLA-Cw6 bei kaukasischen Psoriatikern zu > 65 % (Typ 1) vorkommt (Asahina et al., 1991; Henseler und Christopher, 1985; Schmitt-Egenolf et al., 1996). Dafür herrscht in Japan offenbar eine starke Psoriasis-Assoziation mit HLA-Cw11 (Nakagawa et al., 1990).

	<b>Psoriasis Typ1</b>	<b>Psoriasis Typ2</b>
Manifestationsalter:	Frauen: 16 Männer: 22	Frauen: 60 Männer: 57
HLA-Assoziation:	Cw6, B13, Bw57, DR7	B27, (Cw2)
Krankheitscharakteristika:	hohe Rezidivneigung	geringe Krankheitsaktivität
Familienanamnese:	positiv	negativ

Tab. 1.3.: Typisierung der Psoriasis (Henseler und Christophers, 1985; Christophers und Henseler, 1989).

<b>Name:</b>	<b>Chromosomale Region:</b>
PSORS1	6p21.3
PSORS2	17q
PSORS3	4q
PSORS4	1cen-q21
PSORS5	3q21
PSORS6	19p13

Tab. 1.4.: Bisher im OMIM (online mendelian inheritance in Man; Stand Dezember 2000) veröffentlichte chromosomale Abschnitte, die in das Krankheitsgeschehen der Psoriasis vulgaris involviert sind. In der Literatur werden Kopplung oder Assoziation für viele weitere DNA-Regionen beschrieben.

### 1.8.3. Die genetische Kartierung der Psoriasis vulgaris

Durch umfangreiche Genomanalysen wurden in den letzten Jahren zahlreiche chromosomale Regionen und Kandidaten-Gene für die Psoriasis vulgaris entdeckt. Tabelle 1.4. gibt einen Überblick über die im OMIM (online mendelian inheritance in Man, John Hopkins University; Stand Dezember 2000) angeführten „Suszeptibilitäts-Loci“. Am etabliertesten erscheint bisher der DNA-Abschnitt auf Chromosom 6p.

#### **PSORS1:**

Die Region auf *6p21.3* stellt einen an Genen sehr dichten chromosomalen Abschnitt dar. Von 40 % der 224 erkannten Gene (davon wurden vermutlich 128 exprimiert) wird angenommen, dass deren Funktion mit der Tätigkeit des Immunsystems im Zusammenhang steht. Teilweise gibt es Gene mit mehr als 200 Allel-Varianten, woraus sich eine hohe Anzahl von Polymorphismen ergibt (The MHC sequencing consortium, 1999). Die Gene der HLA-Klasse-I liegen am weitesten in telomerer Richtung, zentromer befindet sich die HLA-Klasse II, und zwischen den beiden ist die Klasse-III-Region mit den Complementfaktoren und beispielsweise dem Gen für TNF- $\alpha$  platziert (s. Abb. 1.3.).

Seitdem Tiilikainen und Mitarbeiter in ihrer ersten Studie (1980) festgestellt haben, dass das relative Risiko, an Psoriasis zu erkranken, für HLA-Cw6-positive Individuen stark erhöht ist, wurde die Assoziation der HLA-Klasse-I-Allele Cw6 und B57 weltweit am häufigsten reproduziert (Elder et al., 1994; Balendran et al., 1999; u.a.). Die HLA-Assoziationen sind von vielen Autoren dahingehend gedeutet worden, dass es sich bei der Psoriasis um eine T-Zell-medierte autoimmune Krankheit handeln könnte.

Neben der HLA-Assoziation wurde ebenfalls mehrmals eine Kopplung von bestimmten MHC-Komponenten auf Chromosom 6 nachgewiesen (Trembath et al., 1997; Burden et al., 1998; Leder et al., 1998; Jenisch et al., Nov. 1998).

Inzwischen hat man herausgefunden, dass mehr noch als die einzelnen HLA-Komponenten spezielle HLA-Haplotypen, d. h. ganze Komplexe von HLA-Allelen, mit Psoriasis vulgaris assoziiert sind (Ikäheimo et al., 1996; Schmitt-Egenolf et al., 1996; Jenisch et al., Mai 1998). Bahnbrechend hierfür war die Studie von Schmitt-Egenolf und Mitarbeitern (1996). Sie zeigten bei 60 Typ1-Psoriatikern aus Nord-Deutschland eine HLA-Assoziation mit dem „extended haplotype“ Cw6-B57-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0303. Dieser wird auf ein Kopplungsungleichgewicht im MHC zurückgeführt und ist von Degli-Eposti und Mitarbeitern



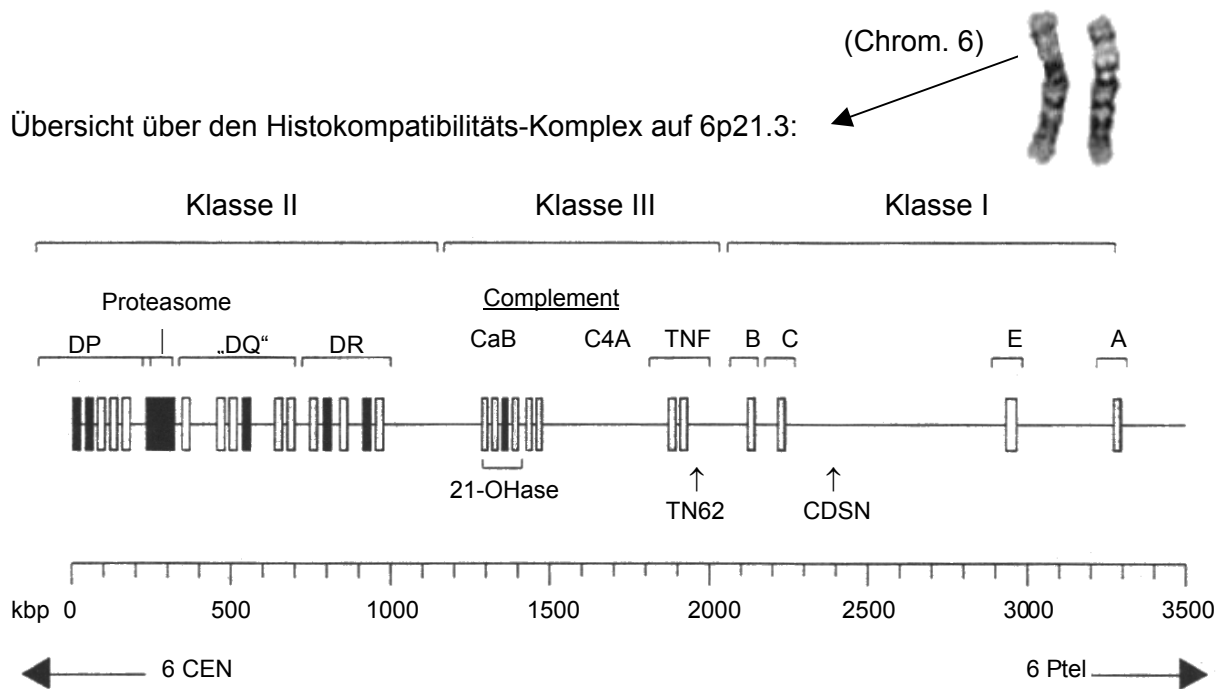


Abb. 1.3.: Der MHC liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6. Dem derzeitigen Stand nach umfasst er insgesamt 3.838.986 Basenpaare: CEN ~ zentromer, Ptel ~ telomer 6p, CDSN ~ Corneodesmosin (<http://www.sanger.ac.uk/HGP/Chr6/MHC.shtml>).

(1992) mit *EH-57.1* benannt worden, wobei die Bezeichnung *AH* („ancestral haplotyp“) hier synonym verwendet werden kann. Die Studie über den *EH-57.1* bei Psoriasis vulgaris (Schmitt-Egenolf et al., 1996) ergab eine starke Assoziation auf der telomeren Seite des Haplotyps, die den Verdacht nahe legt, dass ein „Suszeptibilitäts-Gen“ für Psoriasis vulgaris telomer der HLA-Klasse II, d. h. im Zentrum des MHC oder in der Klasse I, liegen könnte.

Jenisch und Mitarbeiter (Nov., 1998) führten die Haplotyp-Untersuchung mit parametrischen Kopplungsanalysen bei 80 deutschen Großfamilien fort, bestätigten damit den *EH 57.1* (Cw6-B57-DRB1\*0701-DQB1\*0303) von Schmitt-Egenolf und Mitarbeitern (1996) und fanden drei weitere mit *PSORS1* gekoppelte „ancestrale Haplotypen“. In Fall-Kontroll-Untersuchungen zeigten sie, dass die Haplotypen stärker mit *PSORS1* assoziiert sind als die einzelnen HLA-Allele. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten sie analog den Vermutungen einer früheren Arbeit (Jenisch et al., Mai 1998), dass das vermutete Psoriasis-Gen im *ancestralen Haplotyp* liegt, es sich dabei aber nicht um ein bestimmtes HLA-Allel selbst handelt.

Leder und Mitarbeiter (1998) fanden sehr deutliche Anzeichen für eine Kopplung zwischen HLA-B und *PSORS1*. Sie benutzen ein dominantes Vererbungsmodell mit geringer Penetranz (20 %) und erhielten eine geschätzte Rekombinationsrate der beiden Loci von fast 0,00

(LOD = 23,7). Trotz der geographisch und ethnisch unterschiedlichen Herkunft der Familien ergab sich kein Verdacht auf Kopplungs-Heterogenität. Dennoch vermuteten Leder und Mitarbeiter (1998), dass das bei ihnen streng assoziierte HLA-B17 nicht selbst das Krankheitsgen sein kann. Inzwischen weiß man, dass das Allel B57 stärker als B17 mit Psoriasis assoziiert ist. In den frühen Untersuchungen – wie auch hier – wurde aber B57 nicht typisiert.

Eine der Absichten von Jenisch und Mitarbeitern (Mai, 1998) war es, die Lage des PSORS1-Gens mit Hilfe des Tests auf Kopplungsungleichgewichte (TDT) und mit einer parametrischen Kopplungsanalyse im MHC genauer zu bestimmen. Ihre Daten zeigten, dass es Anzeichen für eine Kopplung von HLA-C gibt und dass familiäre und sporadische Psoriasis teilweise mit den gleichen Risiko-Allelen einhergeht.

Zum Forschungsstand über die Feinkartierung im MHC siehe Kapitel 1.8.5..

### **PSORS2 – PSORS6:**

In einer genomweiten Kopplungsanalyse mit polymorphen Mikrosatelliten an 8 Stammbäumen von Großfamilien mit mehreren betroffenen Angehörigen (~ Multiplex-Familien) stießen Tomfohrde und Mitarbeiter (1994) auf eine zweite Kandidatenregion für ein Psoriasis-Gen (PSORS2) auf dem distalen Ende von Chromosom 17q. In der Familie mit dem eindeutigsten Hinweis auf Kopplung lag die Rekombinations-Rate zwischen PSORS2 und dem Marker D17S784 bei 0,04 mit einem maximalen LOD-Wert von 5,33. Es ergaben sich insgesamt Hinweise auf Heterogenität, wobei keine der Familien mit dem Locus auf 17q eine Assoziation mit HLA-Cw6 aufwies und die nicht auf 17q koppelnden Familien nur eine leichte Assoziation.

Matthews und Mitarbeiter (1995) konnten das Kopplungsergebnis für 17q in einer Untersuchung an einer englischen Großfamilie nicht bestätigen. Auch Nair und Mitarbeiter (1995) fanden zunächst keine Anzeichen für Kopplung, insbesondere nicht für den Marker D17S784. Sie benutzten 24 „Multiplex-Stammbäume“ und insgesamt 12 Mikrosatelliten-Marker für Chromosom 17.

Eine weitere Untersuchung von Nair und Mitarbeitern (1997), die diesmal mit einem Kopplungstest auf Rekombinations-Basis und mit Allel-Sharing-Methoden durchgeführt wurde, brachte die Bestätigung von PSORS2 ( $Z_{\max} = 2,09$ , D17S802:  $P = 0,0056$ ). Interessanter Weise entdeckten sie in diesen Kopplungsanalysen weitere neue Regionen (16q:  $Z_{\max} = 2,50$  und 20p:  $Z_{\max} = 2,62$ ). Besondere Relevanz hat das positive Kopplungsergebnis

von Chromosom 16q, da diese Region mit einem vermuteten Gen-Lokus für Morbus Crohn überlappt und eine Assoziation der beiden Krankheiten bekannt ist (Lee et al., 1990).

PSORS3 bezeichnet die Psoriasis-Suszeptibilitäts-Region auf Chromosom 4. Die parametrische Kopplungsanalyse von sechs englischen Großfamilien mit chronischer Plaque-Psoriasis (Matthews et al., 1996) ergab für den Mikrosatelliten D4S1535 auf Chromosom 4q insgesamt ein  $Z_{\max}$  von 3,03 und deren NPL-Analyse ein  $P$  von 0,0026. Die Daten von vier der sechs Familien stimmten gut mit einem hauptverursachenden Gen auf Chromosom 4q überein. Kritisch merkten Matthews und Mitarbeiter (1996) an, dass in den genetischen Studien zur Psoriasis vulgaris die Absicherung der Diagnose durch einen Dermatologen sehr wichtig sei, da sich bei der Analyse dieser Hautkrankheit schnell Fehler durch Phänokopie, inkomplette Penetranz usw. ergeben können.

Grundsätzlich wurden die beiden Regionen 17q und 4q auch durch Samuelsson und Mitarbeiter (1999) bestätigt. Enlund und Mitarbeiter (1999) untersuchten 20 Familien in Süd-Schweden und fanden obendrein eine Kopplung auf Chromosom 3q21 (PSORS5). Die im weiteren durchgeführte NPL-Analyse von 104 süd-schwedischen Familien ergab für diesen Locus ein  $P$  von 0,04 (D3S1589). Um eine homogenere Gruppe zu erhalten, stratifizierten sie die 104 Familien dadurch, dass sie nur mit den 40 Familien rechneten, bei denen mindestens ein Elternteil speziell aus Südwest-Schweden kam. In dieser Gruppe erhielt man für den gleichen Marker einen deutlicheren NPL-Wert von  $P = 0,01$  (D3S1589). Aufgrund dieser Beobachtung zogen Enlund und Mitarbeiter (1999) nochmals 148 neue „single-affected“ Trios speziell aus Südwest-Schweden zu einer TDT-Analyse heran und erhielten hier mit dem gleichen Marker-Set einen maximalen  $P$ -Wert von sogar 0,0007 (D3S1551). Die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Regionen Schwedens geben nach der Einschätzung von Enlund und Mitarbeiter (1999) einen Hinweis auf die Existenz einer „founder mutation“ in der Nähe eines ihrer 3q-Marker.

Überraschender Weise konnte bei der Analyse der Psoriasis-Loci auf Chromosom 6 und Chromosom 17 in Italien keine Kopplung nachgewiesen werden (Capon et al., Jan. 1999). Dafür deckte der partielle Genomscan von Capon und Mitarbeitern (Jan. 1999), die insgesamt 22 italienische Großfamilien mit 108 Betroffenen und 116 Nicht-Betroffenen untersuchten, eine neue putative Region auf Chromosom 1 (PSORS4) auf. Mit dem Marker D1S305 erhielten sie für die gesamte Gruppe beispielsweise ein  $Z_{\max}$  von 3,75 bei einer Rekombinationsrate ( $\theta$ ) von 0,05. In einer weiteren Untersuchung in Italien demonstrierten Capon und Mitarbeiter (1999) mit Hilfe des TDT, dass die Familien mit einer Kopplung auf Chromosom 1 ebenfalls eine Assoziation mit HLA-C aufweisen. Der entsprechende  $p$ -Wert

hierfür lag bei  $p = 0,014$ . Ein definitiver „Beweis“ wurde damit nicht erbracht. Als zweites überprüften sie die Korrelation der NPL-Werte von HLA-C mit denen vom Marker D1S305 auf Chromosom 1. Der gewichtete LOD-Wert für PSORS1 zeigte einen signifikanten Anstieg von der Basislinie. Damit wurde in Italien das erste Mal eine Interaktion zwischen dem Chromosom-6-Lokus und dem putativen Chromosom-1-Lokus nachgewiesen.

Die Untersuchungen von 32 deutschen Großfamilien ergaben jüngst einen deutlichen Hinweis auf ein weiteres Gen auf Chromosom 19p13 (Lee et al., 2000). Die nicht-parametrische LOD-Score-Analyse wies hier ein  $P$  von 0,0002 für den Marker D19S916 auf. Die parametrische Kopplungsanalyse zeigte einen LOD-Wert von 4,06, der einem  $P$ -Wert von 0,0001 entsprach. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens mit 370 Markern mit verschiedenen Vererbungs-Modellen und durch eine Simulation der Ergebnisse mit 20.000 Replikationen zeigte sich ein genomweiter  $P$ -Wert für diesen LOD-Score von  $p = 0,037$ . Als interessantes Kandidaten-Gen auf 19p13 kommt das Gen von ICAM-1 in Frage, dem Nickoloff (Sept. 1999) u. a. eine wichtige Rolle bei der Costimulation der CD<sub>8</sub><sup>+</sup> Zellen durch die APZ zuschreibt. Auch überschneidet sich diese neuste Psoriasis-Region mit einem Suszeptibilitäts-Lokus von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Rioux et al., 2000). Zusätzlich wurde PSORS1 bestätigt und wurden in der Genomanalyse weitere Suszeptibilitäts-Regionen auf Chromosom 8q und 21q identifiziert.

#### 1.8.4. Biochemie und Genetik von Corneodesmosin

Bei Corneodesmosomen handelt es sich um interzelluläre Strukturproteine, die am kontrollierten Desquamationsprozeß der oberflächlich gelegenen Keratinozyten maßgeblich beteiligt sind. Serre und Mitarbeiter (1991) identifizierten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die gegen das plantare Stratum corneum gerichtete waren, ein neues Protein der Corneodesmosomen, das sie *Corneodesmosin* nannten. Es wurde gezeigt, dass sich das Protein in den oberen Schichten des Stratum spinosum zuerst in den cytoplasmatischen Einschlusskörperchen (Keratinosomen) befindet und dann im Stratum granulosum in den interzellulären Anteilen der Desmosomen. Zum Schluss im Stratum corneum konnte man es nur noch im Kern der Corneodesmosomen nachweisen (Serre et al., 1991). Haftek und Mitarbeiter zeigten (1991), dass Corneodesmosin in den „cornified cell envelope“ eingebunden ist, womit die widerstandsfähige 15 nm dicke Proteinstruktur um die Keratinozyten im Stratum corneum gemeint ist.

Kurze Zeit nach Auffinden des Corneodesmosin-Proteins entdeckten Zhou und Chaplin (1993) mit einer Analyse von CpG-Inseln in der MHC-Klasse-1-Region ein 160 kb telomer von HLA-C gelegenes Gen, das sie aufgrund seiner selektiven Expression in der Haut als *S-Gen* bezeichneten. Sie stellten fest, dass die hergeleitete Aminosäure-Sequenz sehr reich an Serin (30,9 %), Glycin (15,7 %) und Prolin (10,2 %) ist und die Sequenz signifikante Ähnlichkeiten zu anderen Komponenten des Stratum granulosum aufweist (Loricrin, Keratin 1 und Keratin 10). Das S-Gen besteht aus zwei Exons, die durch ein Intron von 2,9 kb getrennt werden und ein Protein von 486 AS codieren. In der In-situ-Hybridisierung zeigte sich, dass die Expression des S-Gens speziell in den sich differenzierenden Keratinozyten des Stratum granulosum stattfindet. Der Zusammenhang zum Corneodesmosin von Serre und Mitarbeitern (1991) wurde von Zhou und Chaplin (1993) noch nicht hergestellt. Die Funktion des S-Gens war zunächst unklar. Im Hinblick auf die enge Kopplung zum HLA-Lokus vermuteten die beiden amerikanischen Wissenschaftler jedoch sofort, dass eine Mutation im S-Gen an der Entstehung von Psoriasis beteiligt sein könnte.

Von der französischen Gruppe (Simon et al., 1997; Guerrin et al., 1998) wurde wenige Jahre später der Beweis erbracht, dass *Corneodesmosin* das Genprodukt des *S-Gens* ist. Simon und Mitarbeiter (1997) veröffentlichten einige Experimente, die die Eigenschaften von Corneodesmosin näher bestimmen. Bei der ursprünglichen molekularen Form von 52-56-kDa handelt es sich um ein basisches Phosphoprotein mit einem isoelektrischen Punkt von  $> 8,0$  und hauptsächlich N-glykosidischen Bindungen. Im weiteren Verlauf zeigt sich, dass mit der Reifung der Keratinozyten schrittweise eine Proteolyse des Corneodesmosins von 52-56 kDa bis zu 33 kDa stattfindet (Serre et al., 1991; Lundstrom et al., 1994). Weitere Details vom Modell der „Maturation“ des Proteins in der Epidermis demonstrieren Guerrin und Mitarbeiter (1998). Zunächst einmal bewiesen sie endgültig durch molekulares Klonen der cDNA die Übereinstimmung des S-Gens mit Corneodesmosin. Dabei zeigte sich, dass durch verschiedene Polymorphismen das Protein länger ist als das ursprüngliche Corneodesmosin von Serre und Mitarbeitern (1991). Die Analysen ließen annehmen, dass die C- und N-terminalen Serin- und Glycin-reichen Domänen, die sich wahrscheinlich als Schleifenform konformieren, vor der Desquamation der Keratinozyten beidseitig am Molekül abgespalten werden. Guerrin und Mitarbeiter (1998) vermuteten, dass diese Schleifen die Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen, dass es in Folge der Proteolyse schrittweise zur Aufhebung der adhäsiven Eigenschaften des Proteins kommt und dass damit die regelrechte Desquamation der oberflächlichen Keratinozyten gefördert wird.

Wie gesagt, bereits bei seiner ersten Veröffentlichung wurde das S-Gen als hochverdächtiges Kandidaten-Gen für die Psoriasis vulgaris betrachtet (Zhou und Chaplin, 1993). Ishihara und Mitarbeiter (1996) untersuchten es daraufhin als Erste an einer Gruppe von Psoriasis-Patienten. Die Sequenzierung der beiden Exons nach einer PCR-Amplifikation erlaubte die Identifikation von zwei biallelischen Polymorphismen im ersten Exon und sieben derartigen Polymorphismen im zweiten Exon. Resultierend kam es an der Aminosäure-Position 186 zu einer Substitution von Serin zu Phenylalanin, an Position 393 zum Austausch von Glycin zu Valin und an Position 394 zum Austausch von Serin zu Leucin. Ishihara und Mitarbeiter (1996) kamen letztendlich zu dem Ergebnis, dass das S-Gen scheinbar nicht den primären Defekt bei der Psoriasis vulgaris ausmacht. Sie hatten 63 Individuen mit sporadischer Psoriasis vulgaris mit 88 gesunden Kontrollpersonen verglichen und dabei keinen signifikanten Unterschied für irgendeine der Substitutionen gefunden. Zusätzlich testeten sie die HLA-Typen der Individuen. Auf der einen Seite bildeten sie eine Untergruppe von 27 Psoriatikern, die serologisch HLA-Cw6 und/oder HLA-Cw7 positiv waren, auf der anderen Seite eine Kontrollgruppe mit 28 Personen, die die gleiche HLA-Typisierung hatten. Auch hier ergab sich kein Unterschied von Betroffenen zu Nicht-Betroffenen. Ishihara und Mitarbeiter (1996) vermuten, dass die Polymorphismen des S-Gens vielleicht im Kopplungsungleichgewicht mit bestimmten HLA-Typen stehen.

Tazi-Ahnini und Mitarbeiter (1999) analysierten in einer Fall-Kontroll-Studie die allelische Verteilung der zwei CDSN-Polymorphismen (CDSN ~ Corneodesmosin) an den Nukleotidpositionen +619 und +1243, die den Aminosäure-Positionen 186 bzw. 394 entsprechen. Zunächst bestätigten sie eine signifikante Assoziation von HLA-Cw6 und Psoriasis vulgaris (odds ratio = 7,75). Keine Assoziation wurde beim CDSN-Polymorphismus an Position +619 gefunden, obwohl er in unmittelbarer Nähe von HLA-C liegt und sich im direkten Kopplungsungleichgewicht mit diesem Locus befinden sollte. Allerdings ergab sich eine signifikante Beziehung der Homozygotie des selteneren Allels an Position +1243 zur Psoriasis vulgaris ( $OR_{\text{hom}} = 2,66$ ;  $P = 2 \times 10^{-9}$ ). Dieser Effekt zeigte sich besonders beim Psoriasis-Typ 1a ( $OR_{\text{hom}} = 3,43$ ). Nach der Einordnung von Swanbeck und Mitarbeitern (1995) hatten Tazi-Anini ihre Studiengruppe, die aus 235 sorgfältig ausgewählten nord-englischen Psoriatikern mit Plaque-Psoriasis und 374 gesunden Kontroll-Personen bestand, in die drei Gruppen im Alter von unter 20 Jahren (Typ 1a), zwischen 21 und 40 Jahren (Typ 1b) und über 40 Jahren (Typ 2) unterteilt. Das in der Kontrollgruppe seltene Allel an Position 1243 besaß bei ihnen die Base *Thymin* (Allel 2). Weiterhin zeigte sich, dass die Homozygotie für das krankheitsassoziierte Allel 1243 (T) in Kopplung mit HLA-Cw6 ein

besonderes Krankheitsrisiko darstellte ( $OR_{\text{hom}} = 9,38$ ). Aus diesem Grund vermuteten die Autoren, dass eine Veränderung im S-Gen einen zusätzlichen Faktor bei der Entstehung von Psoriasis vulgaris darstellen könnte.

Tazi-Ahnini und Mitarbeiter (1999) stellten fest, dass die „Trend“-Analyse, die sie herangezogen hatten, um Signifikanz zu erreichen, als Methode nicht gut geeignet war, um den Zusammenhang von HLA-Cw6 und dem S-Gen zu erforschen. Vornehmliches Ziel der Studie von Tazi-Ahnini und Mitarbeitern (1999) mag es - nach meiner Interpretation - zunächst gewesen sein, die Ergebnisse von Ishihara und Mitarbeiter (1996) zu überprüfen und weitere Untersuchungen des CDSN-Gens, z. B. mit dem TDT, anzuregen. Gegen Ishihara und Mitarbeiter (1996) wendeten sie ein, dass deren Studie in Japan eine geringe statistische Power habe und dass bei ihr zu > 95 % sporadische Psoriasis-Fälle verwendet wurden.

Unabhängig von Tazi-Ahnini und Mitarbeitern (1999) gingen Jenisch und Mitarbeiter (1999) vor. Sie sequenzierten erneut das zweite Exon des S- bzw. CDSN-Gens in 86 HLA-typisierten Individuen aus 10 deutschen und 3 amerikanischen (Michigan) Multiplex-Familien. Insgesamt fanden sie 11 „stille“ DNA-Polymorphismen und 7 Varianten mit einer resultierenden Aminosäure-Substitution. Die Analyse der Stammbäume zeigte, dass die einzelnen DNA-Varianten in der Anordnung von 7 Haplotypen in den Familien zu finden waren, bzw. in der Anordnung von 6 verschiedenen Aminosäure-Sequenzen. Der so von ihnen bezeichnete Haplotyp CD2 besaß die Aminosäure Phenylalanin an der polymorphen Basenposition +619 und Serin an Position +1243. Dabei stimmte keines dieser Allele zu 100 % mit der homologen *S-Gen*-Sequenz von Zhou und Chaplin (1993) oder mit der Aminosäure-Sequenz von Guerrin und Mitarbeitern (1998) überein. Alle Allele lagen aber im direkten Kopplungsungleichgewicht mit HLA-B und C. Deswegen handle es sich nach Jenisch und Mitarbeiter (1999) hier nicht um spontane sondern eher um alte und gut konservierte Polymorphismen.

Im Weiteren führten sie mit den Haplotypen CD 1 - 7 einen TDT durch und verglichen die Ergebnisse mit der Assoziation von bestimmten HLA-Haplotypen. Dabei stellen sie fest, dass der Haplotyp CD2, der mit HLA-Cw\*06-B57-DRB1\*07-DQB1\*0303 gekoppelt war, bei den Transmissionen ein höheres relatives Risiko aufwies als HLA-Cw6 alleine. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (CD2:  $t/nt = 3,4$ ; HLA-Cw6:  $t/nt = 2,5$ ). Andere Haplotypen des Corneodesmosin-Gens zeigten keinerlei Transmissionsunterschiede. Jenisch und Mitarbeiter (1999) vermuten, dass die Assoziation der CD-Haplotypen durch ein Kopplungsungleichgewicht mit PSORS1 entsteht. Als Kandidaten-Gen für Psoriasis vulgaris käme das S-Gen aber weiterhin in Frage.

Die Ergebnisse der Untersuchung an der deutschen Bevölkerung von Jenisch und Mitarbeitern (1999) passen sehr gut zum Resultat einer weiteren englischen Assoziationsstudie. Allen und Mitarbeiter (1999) untersuchten mit dem TDT 152 „parent-offspring“-Trios aus 99 unabhängigen Familien-Stammbäumen und erhielten eine sehr signifikant bevorzugte Transmission von Allel 1243 (C) ( $P = 0,0003$ ). Hoch signifikant war der Transmissions-Unterschied für Allel 5, das sich aus dem polymorphen Haplotyp +619 (T → Phe), +1240 (G → Gly) und +1243 (C → Ser) zusammensetzt ( $P = 0,0000028$ ). 38 % der Allel 5-Transmissionen waren unabhängig von den mit der Krankheit assoziierten HLA-Cw6-Haplotypen. Daraus schlossen Allen und Mitarbeiter (1999), dass das S-Gen allein mehr als HLA-C zur Psoriasis prädisponiert. Das von Allen und Mitarbeitern (1999) definierte Allel 5 stimmt mit den zwei Allelen +619 (t) und +1243 (c) mit dem CD2-Haplotyp von Jenisch und Mitarbeitern überein (1999).

#### 1.8.5. Corneodesmosin und TN62 bei der Feinkartierung im MHC

Zu Beginn dieser Arbeit existierten zwei molekulargenetische Studien, die sich unter Kenntnis des *S-Gens* mit der Feinkartierung im MHC auf 6p21.3 beschäftigten (Balendran et al., 1999; Oka et al., 1999). Einen Überblick über die bisher bekannten MHC-Gene zwischen dem anonymen DNA-Mikrosatelliten TN62 und dem S-Gen gibt Tabelle 1.5.. Oka und Mitarbeiter (1999) untersuchten an 76 japanischen Psoriasis-Patienten mit 11 Mikrosatelliten-Markern einen 1060 kb langen Abschnitt nahe dem HLA-C-Lokus. Ihre statistische Analyse über die Verteilung der Allelhäufigkeiten und deren Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ergab ein pathogenetisch relevantes Intervall, das sich 89 – 200 kb in telomerer Richtung vom HLA-C-Gen befindet (> 95 % Konfidenz-Intervall). Zusätzlich zu den Genen POU5F1 (OTOF3 ~ octamer transcription factor), TCF19 (SC1 ~ cell growth-regulated gene) und S (CDSN) sind in diesem 111-kb-Segment noch vier weitere exprimierte Gene bekannt (s. Tab. 1.5.). Nach Einschätzung von Oka und Mitarbeitern (1999) sei das HLA-C-Gen selbst nicht der Primär-Lokus bei der Psoriasis vulgaris. Dies könne man daran erkennen, dass in Japan nur 10 % der Betroffenen HLA-Cw6-positiv sind, während HLA-Cw6 bei kaukasischen Psoriatikern zu > 65 % vorkommt (Asahina et al., 1991; Henseler und Christopher, 1985; Schmitt-Egenolf et al., 1996). Eine Bestätigung ihrer Vermutung, dass PSORS1 telomer von HLA-C liegen könnte, sehen Oka und Mitarbeiter (1999) in den Ergebnissen von Jenisch und Mitarbeitern



(Mai 1998). Das S-Gen als putatives Psoriasis-Gen auf Chromosom 6p schließen sie trotz der widersprüchlichen Ergebnisse der Europäer (Allen et al., 1999; u. a.) und Japaner (Ishihara et al., 1996) nicht aus.

Balendran und Mitarbeiter (1999) platzieren das vermutliche PSORS1-Gen dagegen in ein Intervall von 285 kb zentromer von HLA-C. Diese Lokalisation entspricht der Grenze von HLA-Klasse III und I (s. Abb. 1.3.). Balendran und Mitarbeiter (1999) führten bei 77 unabhängigen englischen Trios mit mindestens zwei betroffenen Kindern u. a. eine Sibpair-Analyse und einen TDT durch. Für die flankierenden Marker des *zentromer* von HLA-C gelegenen Abschnitts erhielten sie im multiallelischen TDT (Spielman und Ewens, 1996) den stärksten Hinweis auf ein Kopplungsungleichgewicht (cen → tel: TN62 =  $1,0 \times 10^{-7}$ , HLA-B =  $4,0 \times 10^{-7}$  und HLA-C =  $2,7 \times 10^{-9}$ ), während die von ihnen ausgewählten Mikrosatelliten-Marker der *telomeren* Seite von HLA-C keine signifikanten Werte erzielten ( $p > 0,05$ ). Bei den betroffenen Individuen bestand der häufigste Haplotyp aus den Allel-Komponenten TN62-3, HLA-B\*5701 und HLA-C\*0602 (91 von 422 Chromosomen). Im engeren Bereich um HLA-C untersuchten Balendran und Mitarbeiter (1999) 6 Marker auf der zentromeren Seite, jedoch nur einen Marker auf einem gleichlangen Abschnitt der telomeren Seite (D6S265,  $p = 0,06$ ). Die Polymorphismen des Corneodesmosin-Gens, die näher an HLA-C liegen als der Mikrosatelliten-Marker TN62, wurden nicht untersucht. Mit Allel 3 des Markers TN62 fand man in dieser Studie den signifikantesten TDT-Wert ( $P = 1,0 \times 10^{-1}$ ) aller eingesetzten Marker. Insgesamt wies TN62 12 unterschiedliche Allele auf.

<b>Nummer im MHC</b>	<b>Name bzw. alternativer Name</b>	<b>Orientierung</b>	<b>Klone Acc.No./ Klone-Name</b>	<b>Gen-Start bis Gen-Ende im MHC (telomer – centromer)</b>
81	CDSN/Corneodesmosin/S-Gen	-	AB023060/ TY1C2	1402815 – 1408151
82	SEEK1	+	AB023060/ TY1C2	...
83	SPR1	-	AB023060/ TY1C2	...
84	HCR	-	AB023060/ TY1C2	...
85	TCF19/SC1	+	AB023059/ TY1G9	1446851 – 1451505
86	POU5F/OTF3	-	D84394/pM30	1452065 – 1458406
87	NOB-Pseudogen	?	D84394/pM30	1520774 – 1524055
88	HCGII-2-Pseudogen	-	D84394/pM30	1539450 – 1540364
89	HCGIX-3-Pseudogen	-	D84394/pM30	1485684 – 1541942
90	NOB5-Pseudogen	?	D84394/pM30	1547155 – 1554972
91	HLA-C	-	D84394/pMN201	1554973 – 1558294
92	HCGIV-2-Pseudogen	+	D84394/pMN201	1559474 – 1559708
93	KIAA0055-hom-Pseudogen	+	D84394/pMN201	1561787 – 1565653
94	RPL3-hom-Pseudogen	+	D84394/pMN201	1566517 – 1567783
95	HCGII-1-Pseudogen	-	D84394/pMN213-5	1631282 – 1642337
96	HLA-B	-	D84394/pMN213-5	1639541 – 1642824
97	HCGIV-1-Pseudogen	+	D84394/pM213-5	1643551 – 1643931
98	DHFRP-Pseudogen	-	D84394/pM213-5	1652530 – 1652644
99	HLA-17-Pseudogen	-	D84394/pM213-5	1652530 – 1652644
100	P5-8-Pseudogen	+	D84394/pM213-5	1669450 – 1671895
101	NOB2-Pseudogen	?	D84394/pM213-5	1672666 – 1673925
102	NOB3-Pseudogen	?	D84394/pM213-5	1633367 – 1680568
103	NOB1-Pseudogen	?	D84394/pM67	1685992 – 1687689
104	HCGIX-2-Pseudogen	-	D84394/pM67	1685798 – 1695923
105	MICA	+	D84394/pM67	1689269 – 1700988
106	HLA-X-Pseudogen	-	AB000879/ TY3A9	1747684 – 1748329
107	P5-1 Gen (?)	+	AB000879/ TY3A9	1749030 – 1751648
108	3.8-1.1 Gen (?)	+	AB000879/ TY3A9	1757066 – 1758245
109	HCGIX-1-Pseudogen	-	AB000879/ TY2A9	1780146 – 1791139
110	MICB/PERB11.2	+	AB000879/ TY2A9	1784009 – 1796938
111	BAT1	-	AC006046/r9a	1812747 – 1822495
112	ATP6G/NG38 VATG	-	AC006046/m9a	1827355 – 1828502
113	NFKBIL1/IKBL	+	AC006046/m9a	1829637 – 1840552
114	LTA/TNF-beta/lymphotoxin A	+	AF129756/ 201G24	1857673 – 1858623
115	TNF/TNF-alpha/cachectin	+	AF129756/ 201G24	1860672 – 1862467
116	LTB/TNF-c/lymphotoxin B	-	AF129756/ 201G24	1865639 – 1867347
117	LST1/B144	+	AF129756/ 201G24	1872230 – 1873606
118	1C7	-	AF129756/ 201G24	1873997 – 1877630
119	AIF1/G!	+	AF129756/ 201G24	1900240 – 1901810
120	BAT2/G2	+	AF129756/ 201G24	1907693 – 1922490

Tab. 1.5.: MHC-Gene des Menschen aus dem Abschnitt von CDSN bis BAT2/G2. Der Mikrosatellit TN62 liegt 285 kb zentromer von HLA-C zwischen NFKBIL1 (Nr. 113 ) und LTA (Nr. 114). Insgesamt befinden sich im MHC 229 Gene, von denen wahrscheinlich 50 % exprimiert werden (Stand: 31.05.2000; <http://www.sanger.ac.uk/HGP/Chr6/MHC.shtml>; Shiina et al., 1999).

## 1.9. Fragestellung

Die Fragestellung dieser Arbeit bezieht sich auf die Feinkartierung des Psoriasis-Suszeptibilitäts-Gens *PSORS1* im MHC-Komplex. Wie sich aus den Abschnitten 1.8.2. und 1.8.3. ergibt, enthält die HLA-Region ein entscheidendes Suszeptibilitäts-Gen für die Psoriasis vulgaris. Die Darstellung in den Abschnitten 1.8.4. und 1.8.5. weist darauf hin, dass das CDSN-Gen aufgrund seiner physiologischen Funktion und seiner bisherigen molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse weiterhin für die Psoriasis vulgaris als Kandidaten-Gen im HLA-Bereich in Frage kommt. Zu berücksichtigen ist, dass bei der Vererbung der Psoriasis vulgaris geschlechtsspezifische Effekte eine Rolle spielen (s. Abschnitt 1.8.1.).

Nun stellt sich die Frage, ob sich die Psoriasis-vulgaris-Assoziation des *Corneodesmosin-Polymorphismus 1243* ebenfalls in einer großen deutschen Studiengruppe nachweisen läßt. Zweitens, welches Ergebnis zeigt sich diesbezüglich in derselben Patientengruppe für den zentromer gelegenen anonymen DNA-Mikrosatelliten *TN62*? Drittens, gibt es eventuell Allel-spezifische *Transmissions-Effekte* der maternalen bzw. paternalen Vererbung der Risiko-Allele von CDSN\*1243 und TN62?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden 210 Familien rekrutiert, in denen die Kinder und i. d. R. auch ein Elternteil Psoriasis vulgaris hatten, wurden die beiden Marker TN62 und CDSN\*1243 genotypisiert und diese Daten in einem TDT untersucht. In einem weiteren Test wurden die paternalen und maternalen Allel-Transmissionen getrennt betrachtet und die Geschlechter der betroffenen Indexpersonen berücksichtigt.

## 2. Methoden

### 2.1. Assoziationsstudien mit internen Kontrollen

Ziel unserer genetischen Analyse ist es, die Genotypen des „single nucleotid polymorphism“ (SNP) CDSN\*1243 und des Mikrosatellit tn62 in Familien mit an Psoriasis vulgaris erkrankten Kindern zu bestimmen und zu untersuchen, ob ein bestimmtes Allel von CDSN\*1243 oder tn62 mit Psoriasis assoziiert ist. Dabei benutzen wir als biomathematisches Instrument den Transmissions/Disequilibrium-Test (TDT) nach Spielman (1993). In diesem Abschnitt soll kurz die Entwicklung, Technik und Aussage dieser häufig verwendeten Methode beschrieben werden.

Bei den klassischen Assoziationsstudien mit einem Fall-Kontroll-Aufbau besteht eine Schwierigkeit darin, die richtige, d. h. gut „gematchte“, Kontrollgruppe zu finden (Kap. 1.4.1.). Als Alternative bieten sich daher Assoziationsstudien mit internen Kontrollen an, die den Fehler 1. Art vermeiden. Rubinstein und Mitarbeiter (1981) und Falk und Rubinstein (1987) entwickelten im Zusammenhang mit Untersuchungen des HLA-Komplexes und des Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (IDDM) die Methode des HRR (haplotype relative risk). Diese Methode etablierte sich als ein auf Familien basierender Assoziationstest (Field et al., 1986; Ott, 1989) und wird in der Literatur auch als AFBAC-Methode (affected family based controls, Thomson 1995) bezeichnet. Über einzelne betroffene Kinder werden Familien nach dem Zufallsprinzip gesammelt und die Genotypen eines Markers bei Eltern und Kind typisiert. Die nicht von den Eltern an das betroffene Kind vererbten Allele werden als „interne Kontrolle“ (Lander und Schork, 1994) benutzt und mit den weitergegebenen Allelen in einem  $2 \times 2$  Kontingenz-Test verglichen.

Allerdings sind mit diesem Vorgehen die Probleme der Fall-Kontroll-Studien nicht gänzlich behoben. Da bei den Transmissionen sowohl homozygote als auch heterozygote Eltern berücksichtigt werden, ist die Auszählung der Allele von den Allel-Frequenzen der jeweiligen Bevölkerung abhängig: Ein homozygoter Elternteil mit dem Genotyp  $A_1A_1$  gibt sein Allel  $A_1$  zwangsläufig an das Kind weiter. Dieser Fall ereignet sich im Verhältnis weniger häufig, wenn  $A_1$  das seltenere Allel ist und somit weniger Eltern in der untersuchten Population homozygot für dieses Allel sind. Damit impliziert die AFBAC/HRR-Methode weiterhin eine Abhängigkeit von der Bevölkerungsstruktur.

Der Transmissions/Disequilibrium Test (TDT) kann als eine Weiterentwicklung der Methode von Falk und Rubinstein (1987) angesehen werden. Nachdem bereits andere Autoren ein ähnliches Vorgehen angewandt hatten (Parsian et al., 1991), stellten Spielman und Mitarbeiter (1993) den TDT vor - einen Test auf Kopplung zwischen Krankheitslokus und Markern, für die eine Bevölkerungs-Assoziation gefunden wird. Im Zusammenhang mit einer genetischen Analyse zum IDDM untersuchten sie die statistischen Eigenschaften und die Aussagekraft des Tests.

Wie wird der TDT durchgeführt?

Wie die anderen Assoziationsstudien mit internen Kontrollen basiert der TDT auf einer Sammlung von genotypisierten „Falk-Rubenstein-Trios“. Er berücksichtigt jedoch nur Eltern, die heterozygot für unter Umständen mit einer Krankheit assoziierte Marker sind, und vergleicht die Häufigkeiten, mit denen ein Marker-Allel oder dessen Alternativ-Allele auf die betroffenen Nachkommen weitergegeben werden. Als Beispiel betrachte man den Marker-Lokus M mit den Allelen  $M_1$  und  $M_2$ , bei dem die Genotypen der betroffenen Kinder und die der Eltern bestimmt wurden (Abb. 2.1.).

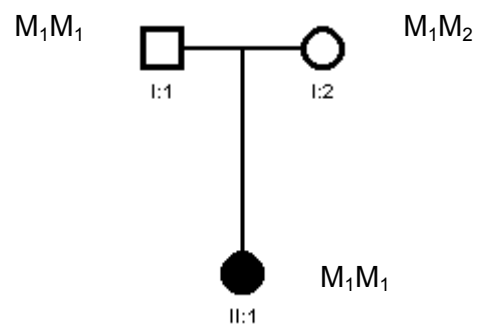


Abb. 2.1.: Stammbaum eines Falk-Rubinstein-Trios mit den Genotypen der Personen für den Marker-Lokus M. Die heterozygote Mutter gibt Allel  $M_1$  an ihre betroffene Tochter weiter. Der homozygote Vater überträgt Allel  $M_1$  dagegen zwangsläufig.

Von den Genotypen der Eltern  $M_1M_1$ ,  $M_1M_2$  oder  $M_2M_2$  ausgehend zählt man die Transmissionsereignisse folgendermaßen (Spielman et al., 1993):

- Anzahl der  $M_1$ -Transmissionen vom elterlichen Genotyp  $M_1M_1$  auf das betroffene Kind;
- Anzahl der  $M_1$ -Transmissionen vom elterlichen Genotyp  $M_1M_2$  auf das betroffene Kind;
- Anzahl der  $M_2$ -Transmissionen vom elterlichen Genotyp  $M_1M_2$  auf das betroffene Kind;
- Anzahl der  $M_2$ -Transmissionen vom elterlichen Genotyp  $M_2M_2$  auf das betroffene Kind.

Die statistische Auswertung erfolgt standardisiert mit einer Vier-Felder-Tafel, in der die ausgezählten Ereignisse a, b, c und d eingetragen sind.

Tab. 2.1.: Kombinationen der transmittierten und nicht-transmittierten Marker-Allele  $M_1$  und  $M_2$  von  $2n$  Eltern auf  $n$  betroffene Kinder (Spielman et al., 1993).

Transmittierte Allele	Nicht-transmittierte Allele		Insgesamt:
	$M_1$	$M_2$	
$M_1$ . . . . .	a	b	a + b
$M_2$ . . . . .	c	d	c + d
Insgesamt . . . . .	a + c	b + d	2 n

Am Ende errechnet man die Signifikanz des Unterschieds von b und c mit einer binominalen Teststatistik. Als allgemein übliche Approximation gilt hier der „McNemar-Test“ (Sokal und Rohlf, 1969). Die Prüfgröße nach McNemar ist  $\chi^2$ -verteilt mit einem Freiheitsgrad und ergibt sich aus dem Term:

$$\chi^2 = (b - c)^2 / (b + c)$$

Der maßgebliche Unterschied zu den Methoden der AFBAC/HRR-Tests ist, dass der TDT nur die Transmissionen von heterozygoten Eltern berücksichtigt (Punkt b und c.). Hinter dieser Einschränkung, die leider häufig einen Verlust an Datenmenge zur Folge hat, steht der Gedanke, dass Allel  $M_1$  und  $M_2$  unabhängig voneinander an einen betroffenen Nachkommen vererbt werden, außer wenn eines der beiden Allele als assoziierter Marker mit dem Krankheitslokus gekoppelt transmittiert wird.

Was sagt der TDT aus?

Besteht keine Kopplung zwischen Marker und Krankheitslokus, müssen  $M_1$  und  $M_2$  unabhängig voneinander segregieren. Ausgehend von den heterozygoten Eltern ergibt der TDT selbst in Anwesenheit einer interferierenden Bevölkerungsstruktur keine positive Assoziation. Umgekehrt zeigt sich auch kein Transmissions-Unterschied, wenn zwar Kopplung vorhanden ist aber keine Assoziation des Allels. Der TDT prüft somit Kopplung und Assoziation gleichzeitig. Zu beachten ist allerdings, dass dies nur dann der Fall ist, wenn nicht mehrere Trios pro Familie benutzt werden („simplex only“, Spielman und Ewens, 1996).

Zusammenfassend lässt sich sagen: Der TDT ist ein Test, der in Gegenwart einer Allel-Assoziation eine Kopplung ermitteln kann. Der Test hat den Vorteil, dass er nicht von einer

genetisch inhomogenen Bevölkerung gestört wird. Führt man ihn mit einer *Simplex-Trio*-Studiengruppe durch, weist er Kopplung und Assoziation zusammen nach und verdient er zu Recht den Namen „Transmissionstest auf Kopplungsungleichgewichte“.

## 2.2. Auswahlkriterien und Auswahlmodus

Auswahlkriterien zur Rekrutierung der teilnehmenden Probanden haben für die Aussagekraft und Qualität der Assoziationsstudie eine große Bedeutung. Deren Festlegungen richten sich nach dem Studienkonzept des TDTs und sind im Sinn der Fragestellung zur Psoriasis vulgaris begründet. Bei unserer Untersuchung bestanden im einzelnen fünf Festlegungs-Punkte:

(1) Familienkonstellation:

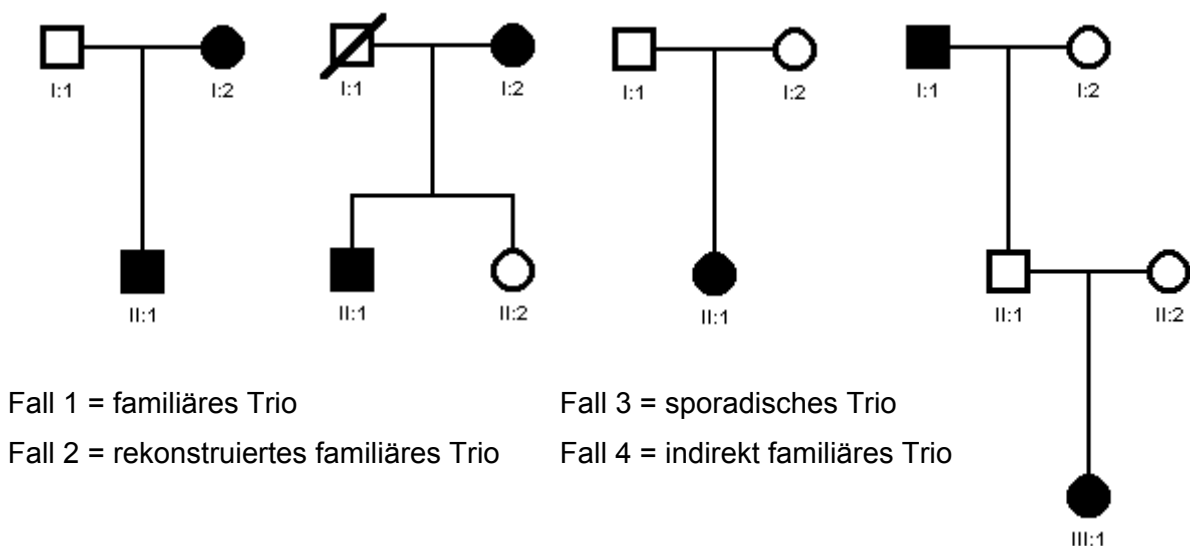


Abb. 2.2.: Triokonstellationen, die für den TDT bzw. RC-TDT zugelassen wurden

Wie in Abbildung 2.2. (Fall 1 bis 4) zu erkennen ist, benötigt man für den TDT Familien-Trios mit einem betroffenen Kind. In dieser Studie bezieht sich die Fragestellung speziell auf die familiäre Psoriasis. Ziel war es, Trios mit einem ebenfalls betroffenen Elternteil zu sammeln (Fall 1). Diese *direkt familiären Trios* waren jedoch nicht leicht zu rekrutieren. Um eine höhere Trio-Anzahl zu erhalten, wurden deshalb ebenfalls *indirekt familiäre Trios* zugelassen (Fall 4). Nur ein kleiner Teil der gesammelten Trios bestand aus *sporadischen Fällen* (Fall 3), wobei hier jedoch noch das Erkrankungsalter bei Erstmanifestation („age of

onset“) für einen Typ1-Psoriasis sprechen kann. Einen Sonderfall bilden Situationen, in denen ein Elternteil fehlt. Zu Recht weisen Curtis und Sham (1995) darauf hin, dass diese Fälle beim Testen mit „biallelischen“ Markern mit unterschiedlichen Allel-Frequenzen zu einer Verzerrung der Werte führen und deshalb ausgeschlossen werden müssen. Mit der Methode des *RC-TDT* (Knapp, 1999), die zusätzlich zum erkrankten Kind die Genotypen weiterer Geschwisterkinder benötigt (Fall 3), läßt sich jedoch der Genotyp der fehlenden Eltern rekonstruieren und der TDT auch hier anwenden. Allgemein haben wir nur „Simplex“- und nicht „Multiplex-Trios“ verwendet.

(2) Erkrankungsalter bei Erstmanifestation („age of onset“):

Das „Age of Onset“ der betroffenen Indexpersonen sollte unter der Altersstufe von 40 Jahren liegen. Nur der Psoriasis-Typ1 (Henseler und Christophers, 1985), bei dem Betroffene eine HLA-Assoziation und Neigung zur generalisierteren Form der Psoriasis zeigen, soll untersucht werden.

(3) Angabe der Indexperson:

Die Person, über die ein Trio rekrutiert wird, bezeichnet man als Indexperson. Unsere Familien wurden über die betroffenen Kinder als Indexpersonen gesammelt.

(4) Betroffenheit/Nicht-Betroffenheit:

Als *Betroffene* gelten im Studienkollektiv Individuen, die eindeutige Zeichen einer Psoriasis vulgaris oder eine sichere Krankengeschichte hierzu aufweisen konnten. *Nicht-Betroffene* sind nach der Begutachtung durch einen geschulten Mitarbeiter nur die Teilnehmer ohne Anzeichen für Psoriasis vulgaris oder eine andere Form der Schuppenflechte.

Probanden mit einer Psoriasis arthropathica wurden nicht als Indexperson zugelassen. Probanden mit Psoriasis pustulosa wurden weder als Betroffene noch als Nicht-Betroffene, Indexpersonen oder Angehörige in die Untersuchung miteinbezogen.

(5) Herkunft der Familie

Ein Kopplungsungleichgewicht findet man am ehesten in einer von der Abstammung her einheitlichen Population. Aus diesem Grund haben wir nach Möglichkeit Familien westfälischen Ursprungs rekrutiert.

Ein wichtiger Aspekt bei der Gewinnung der Familien für diese Studie ist, dass alle teilnehmenden Familien und ihre einzelnen Angehörigen über die geplanten Untersuchungen aufgeklärt wurden und sich mit ihnen einverstanden erklärten. Dazu wurden schriftliche



Aufklärungsbögen verwendet und die Empfehlungen der Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe beachtet. Aufgrund unserer Auswahlkriterien wird erwartet, dass sich die erarbeitete Studiengruppe für die Fragestellung in besonderem Maße eignet.

### 2.3. Rekrutierung der Familien

In den Jahren 1999 und 2000 erfolgte ausgehend von der Universitätshautklinik Münster die Rekrutierung und der Besuch der Probanden mit ihren Familien. Im allgemeinen bestand unser Vorgehen darin, nach vorheriger Rücksprache und Zustimmung in bestimmten Einrichtungen Informations- und Fragebögen auszulegen (s. Anhang I.2.) oder dort selbst präsent zu sein und Psoriasis-Patienten direkt auf unser Projekt aufmerksam zu machen. Folgende Stellen haben sich als Rekrutierungsschwerpunkte erwiesen:

- Klinikbereich Psoriasis der Fachklinik Bad Bentheim
- Ambulanz und Stationen der Universitätshautklinik Münster
- Apparategemeinschaft niedergelassener Dermatologen in Münster
- Kooperierende Hautarztpraxen aus der Umgebung

Bis auf wenige Ausnahmen stießen wir bei den Betroffenen auf ein reges Interesse an einer weiteren Aufklärung der Psoriasis durch wissenschaftliche Untersuchungen. Damit war auch die große Bereitschaft verbunden, unsere Fragen zur Krankheitsausprägung und Familienkonstellation zu beantworten. Um ein geeignetes Trio zu finden, musste meist eine große Zahl von möglichen Indexpersonen kontaktiert werden, da viele Familien nicht den Aufnahmekriterien der Studie entsprachen. Es sollten möglichst beide Elternteile zur Verfügung stehen, was bei älteren Indexpersonen häufig nicht mehr der Fall war. Zu Schwierigkeiten kam es, wenn Familienmitglieder zu weit auseinander wohnten. Manche Familien konnten nicht in die Studie einbezogen werden, weil ein Familienmitglied die Blutabnahme ablehnte. Auf der Suche nach familiären Trios konnten von 400 Fragebögen, die je von einer betroffenen Person ausgefüllt wurden, letztendlich nur 40 Familien identifiziert und später real zu Hause besucht werden. Dafür waren etwa auch 400 Telefonate im Vorfeld notwendig. Die eigene Leistung bestand darin, 40 neue Trios zu Hause zu besuchen und klinisch zu charakterisieren.

#### 2.4. Befragung, Untersuchung und Blutabnahme

In der Regel fand die Befragung, Untersuchung und Blutabnahme im Rahmen eines Hausbesuches statt, der je nach Interesse der Teilnehmer ein bis zwei Stunden in Anspruch nehmen konnte. Die Anfahrtswege mit einer durchschnittlichen Entfernung von ca. 60 km führten in die nähere Umgebung von Münster, in die Regionen von Bad Bentheim, Osnabrück/Minden, Oldenburg/Bremen, Dortmund/Essen und Paderborn/Bielefeld. Bei manchen Familien waren wiederholte Besuche erforderlich. So wurden für die Rekrutierung insgesamt > 5200 km an Fahrtwegen zurückgelegt.

Jeder Besuch ging mit einer dermatologischen Untersuchung aller teilnehmenden Familienmitglieder einher. Dabei war es von Vorteil, dass sich die Psoriasis vulgaris relativ schnell und ohne aufwendige Methoden diagnostizieren lässt. Bei Fällen mit geringer Ausprägung wurden nur Betroffene mit einer sicheren Psoriasis-Vorgeschichte berücksichtigt. In der Regel waren die meisten Betroffenen durch ihren Hautarzt vordiagnostiziert.

Die Befragungsergebnisse, insbesondere die persönlichen Daten „Alter“ und „Age of Onset“, und die Befunde der Untersuchung wurden auf dem Einverständnis- und Fragebogen dokumentiert, der im Anhang A.3. angefügt ist. Bei der Blutentnahme verwendeten wir je Teilnehmer drei EDTA-Röhrchen zu 9 ml.

Die hier vorgelegte molekulargenetische Untersuchung bezieht sich auf eine Gesamtgruppe von 210 Familien mit 671 Personen.

## 2.5. Molekulargenetische Methoden

Der zweite praktische Arbeitsteil umfasste die Generierung der Daten in einem molekulargenetischen Labor, das auf die genetische Analyse mit Mikrosatelliten spezialisiert ist (Max Delbrück Centrum, Berlin-Buch, 2000). Für die Genotypisierung des Polymorphismus CDSN\*1243 und des Mikrosatelliten-Marker tn62 waren einige molekulargenetische Methoden notwendig, deren Prinzipien ich zunächst erläutern möchte.

### 2.5.1. Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion, engl. abgekürzt PCR, ist in den USA als eine In-vitro-Labortechnik entwickelt worden, mit der definierte DNA-Fragmente (50 bp - > 1.000 bp) mit sehr hoher Spezifität vervielfältigt werden können (Saiki et al., 1985). Für die im PCR-Gerät automatisierte, zyklische/enzymatische Reaktion ist ein Überschuss an Nucleinsäuren notwendig.

Nach der Denaturierung der DNA lagern sich an die Einzelstränge ausgewählte sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer an, von deren 3'-Hydroxyl-Ende aus die thermostabile Taq-Polymerase nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung einen neuen Gegenstrang synthetisiert. Zum Einbau der Nucleotide benötigt das Enzym  $Mg^{++}$ -Ionen als Cofaktor. An der Strang-Kopie determiniert der Downstream-Primer eine Synthese zurück zum 5'-Ende. Diese Duplikate dienen in den kommenden Reaktionszyklen als Matrizen. Es folgt eine exponentielle Akkumulation des gewünschten DNA-Abschnitts. Somit besteht ein Zyklus aus den drei Teilen:

1. Denaturierung: Auftrennung des DNA-Doppelstranges bei einer Temperatur von  $> 92^{\circ}C$  in seine beiden Einzelstränge.
2. Primer-Anlagerung (Annealing): Beim Abkühlen auf eine niedrigere Temperatur ( $37^{\circ} - 72^{\circ}C$ ) lagern sich die Primer - die Zielregion flankierend - der DNA an.
3. Primer-Extension: Bei einer Temperatur von  $72^{\circ}C$  erfolgt die Polymerase abhängige Kettenverlängerung und der Abschluß des Amplifizierungszyklus.

Abweichend von der bei 35 Zyklen theoretisch vorstellbaren Ausbeute von  $34 \times 10^9$  Kopien liegt die Effizienz der Reaktion in der Praxis üblicherweise zwischen 70 - 80 %. Bei anfänglich exponentiellem Verlauf kommt es nach einer gewissen Zykluszahl zum sogenannten „Plateau-Effekt“. Ein Anstieg der Schmelztemperatur der DNA-Doppelstrang-Moleküle, eine kompetitive Hemmung von Primer-Anlagerung und „Reannealing“ der Produktstränge und eine fortschreitende thermische Inaktivierung der Polymerase

(Halbwertszeit der Taq-Polymerase bei 95 °C ca. 40 min) spielen dabei eine Rolle. Zu berücksichtigen ist auch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms, die zu einem Verdau der Matrizen führt.

Bei der Durchführung einer PCR gilt es, ein Optimum zwischen Ausbeute und Amplifizierungsspezifität zu finden. Von entscheidender Bedeutung ist die Qualität und Reinheit der eingesetzten *Template-DNA*. Bei der Primer-Wahl ist zu beachten, dass deren Schmelztemperatur ungefähr gleich ist, sie nicht gegenseitig komplementär sind und sie keine speziellen Palindrome besitzen, die zu Haarnadelstrukturen, d. h. einer „Selbstrückfaltung“, tendieren. Zahlreiche Variablen wie die Konzentrationen der  $Mg^{++}$ -Ionen, dNTPs oder des Enzyms lassen sich für eine PCR strategisch beeinflussen. Am schnellsten zum Ziel führt oft schon die Modifikation der Zyklusteile nach Zeit und Temperatur. Die von uns angewandten Optimierungsstrategien werden genauer in Kapitel 2.6.4. dargestellt.

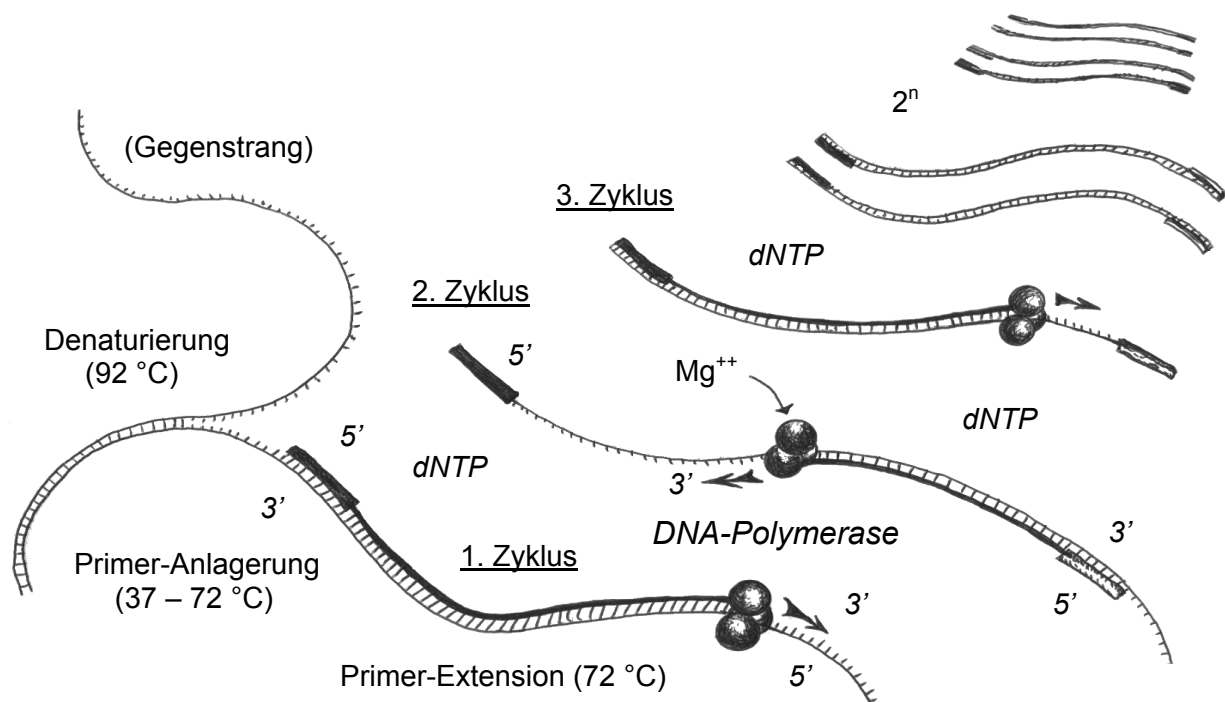


Abb. 2.3.: Schematische Darstellung der PCR. Die Amplifizierung am Gegenstrang ist nicht abgebildet.

## 2.5.2. Prinzip und Technik der Genotypisierung von Mikrosatelliten

Wie die Ausführungen in Kapitel 1.6. zeigen, benötigt man für die Kartierung von Krankheits-Genen eine große Anzahl an polymorphen Markern. Bereits seit den 70er Jahren benutzt man Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (DNA-RFLPs). Als in der Regel biallelische Marker besitzen sie auf Grund häufiger Homozygotie wenig Informativität (polymorphism information content, PIC < 0,375). Eine Verbesserung brachte die Entdeckung der VNTR-Minisatelliten (variable number of tandem repeats), die viele Allele und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen, dass eine zufällig ausgewählte Person heterozygot für den Marker ist. Dagegen aber gleichmäßiger und in hoher Zahl über das gesamte Genom verteilt sind die Mikrosatelliten (Jeffreys et al., 1988), wobei es sich hier um kurze repetitive Mono-, Di-, Tri-, und Tetra-Nukleotide handelt, die für das PCR-Standard-Verfahren gut geeignet sind. Im humanen Genom befindet sich im Schnitt alle 7.000 bp ein Mikrosatellit, so dass hiermit eine relativ dichte genetische Karte erstellt werden kann (Automatische Genetische Analyse, Mertes, 1997). Sie befinden sich sowohl in codierenden als auch in nicht codierenden DNA-Abschnitten. Genetisch kartiert wurden eine Vielzahl von Markern beim CEPH (Centre d'Études de Polymorphisme Humain, DIB et al., 1996) oder in der sog. Marshfield-Karte (Broman et al., 1998).

Mit welcher Technik werden die Allele der Mikrosatelliten bestimmt?

Die Polymorphie der Allele von Mikrosatelliten drückt sich in der Variabilität der Länge der sich wiederholenden Nukleotidmuster aus. So kann ein Allel die Sequenz {AT...CAA (GT)<sub>20</sub> ATG...CT} besitzen, wohingegen ein Zweites die Sequenz {AT...CAA (GT)<sub>28</sub> ATG...CT} trägt. Sind die flankierenden Sequenzen des Mikrosatelliten bekannt (AT...CAA und ATG...CT), lassen sich mit den entsprechenden Primern von diesem Bereich in einer PCR millionenfach Kopien herstellen, deren Länge in einer Gelelektrophorese unterschieden werden kann.

Die Mikrosatelliten-Analyse mit Hilfe eines Sequenzierautomaten (Auflösung bis zu 1 bp) basiert heutzutage auf der Fluoreszenzfarbstoff-Markierung der DNA-Primer. Laser können sehr geringe Mengen der kovalent an die Oligonukleotid-Primer gebundenen Fluorophoren zu Lichtemissionen unterschiedlicher Wellenlängen anregen. In Polyacrylamid-gelen ist der Logarithmus der DNA-Fragmentgröße umgekehrt proportional zur Wanderungs-Geschwindigkeit. Im Gelelektrophoreseautomat werden die DNA-Stücke über Spektralanalyse und CCD-Aufnahmetechnik nach Größe und Wellenlänge gesondert

detektiert. Auf diese Art und Weise lassen sich in einem Gel-Lauf bei günstiger Auswahl der Mikrosatellitenlängen über 10 dieser Marker gleichzeitig testen. Die farbmarkierten Oligonukleotide sind nach den Strukturen der beispielsweise verwendeten [F]-Amiditen mit FAM (blau), TET (grün) und HEX (gelb) bezeichnet. Als Bezugsgröße zur Fragment-Längenberechnung nach der Elektrophorese dient ein meist laborinterner Längenstandard, für den eine separate Farbmarkierung reserviert wird (ROX = rot).

Zur Untersuchung der 210 Familien-Trios benutzten wir Kapillarsequenzierer, die gegenüber Polyacrylamidgel-Apparaten für allgemein kleine Fragmente eine erhöhte Analysegeschwindigkeit und Automatisiertheit aufweisen. Hierbei werden hohe Spannungen eingesetzt, um Moleküle unterschiedlicher Ladung und Größe zu trennen. Die Kapillaren besitzen einen Innendurchmesser im Mikromillimeterbereich und eine variable Trennstrecke, wobei die Temperatur im Gerät konstant gehalten werden muss. Wichtig ist neben der Reinheit der von uns mehrmals benutzten Gelmatrix insbesondere die Vermeidung von Elektrosmose in den Kapillaren. Die Injektion der Moleküle geschieht gut steuerbar über ein Drucksystem. Ein an die Maschine angeschlossener Rechner verarbeitet die Detektionssignale

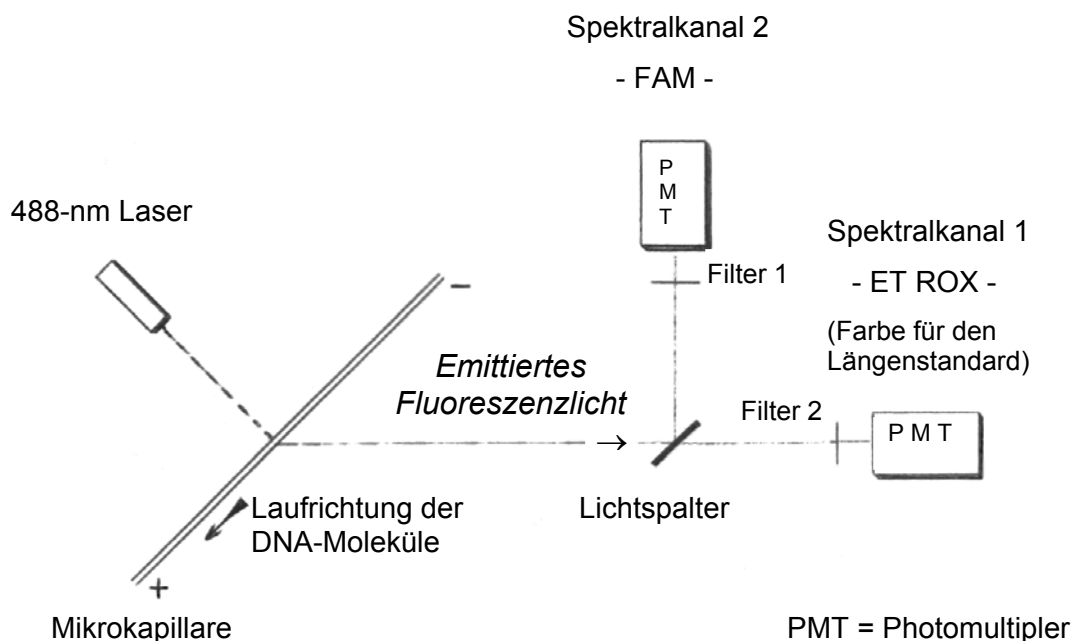


Abb. 2.4.: Schema zur automatischen Laser-Scanning-Technologie des Kapillarsequenzierers. Erläuterung: Der MegaBACE™ arbeitet mit insgesamt vier verschiedenen Spektralkanälen. Jeder Einzelne wandelt die Signale einer Fluoreszenzfarbe mit Hilfe des Photomultiplers in elektrische Impulse um. Kanal 3 und 4 (nicht abgebildet) verwendet einen 532-Laser und erfasst nach dieser Einstellung die Markerfarben HEX bzw. TET. Die Registriervorgänge finden in allen 96 Kapillaren gleichzeitig statt.

in den gleichzeitig laufenden 96 Kapillaren. Von ihm aus werden auch die zahlreichen Elektrophorese-Parameter eingestellt und überwacht (Technik des Kapillarsequenzierers s. Abb. 2.4.).

Nach der Elektrophorese erfolgt die Auswertung der Rohdaten in einem Allel/Genotypisierungsprogramm. Mit den Werten des Längenstandards wird eine Kalibrierungskurve erzeugt, von der aus sich die Längen der unbekanntenen Fragmente extrapolieren lassen.

### 2.5.3. Prinzip der SNP-Analyse

Viele genetische Polymorphismen bestehen aus Substitutionen einer einzelnen Base im DNA-Strang. Dieses Phänomen beschreibt der Begriff „single nukleotid polymorphism“ (SNP). Die häufig verwendete Methode, bei der man SNPs mit Hilfe von Restriktionsenzymen klassifiziert, mag im Vergleich zur in Kapitel 2.5.2. beschriebenen Technik elegant und einfach erscheinen.

Restriktionsendonukleasen erkennen sehr spezifisch Basensequenzen der DNA-Doppelhelix und schneiden in jedem Strang einmal die Phosphodiesterbindung. Bereits die Substitution einer Base aus der Erkennungsregion entscheidet über die Tätigkeit des Enzyms. Diese präzisen „Skalpelle“ findet man als „Werkzeug der Natur“ in vielen Prokaryonten. Ihre Aufgabe besteht darin, fremde DNA zu eliminieren. Zelleigene DNA wird durch Methylierung vor dem Enzym geschützt. Die Bezeichnung eines Restriktionsenzym setzt sich aus der dreibuchstabigen Abkürzung des Wirtsorganismus und einer römischen Zahl zusammen (Stryer, 1991).

Wie geht man bei der SNP-Analyse mit Restriktionsenzym und Agarose-Gel vor?

Um einen SNP im Gen eines Probanden zu bestimmen, ist als erstes eine Amplifizierung des DNA-Abschnittes notwendig, auf dem sich der Polymorphismus und damit die Erkennungsregion und Schnittstelle eines Restriktionsenzym befindet. Man bedient sich der Polymerasekettenreaktion. Das Segment der flankierenden Primer sollte eine Größenordnung aufweisen, die sich zu einer Auftrennung im Agarose-Gel eignet (0,2 – 60 kb). Anschließend werden die angereicherten Strangkopien über mehrere Stunden mit dem Restriktionsenzym bei einer bestimmten Temperatur inkubiert. Der dritte Arbeitsschritt besteht aus der Kontrolle der Inkubationsprodukte in der Agarose-Gelelektrophorese. Die Wanderung der Fragmente im elektrischen Feld hängt von der Größe und Konformation der DNA, von Stromstärke,

Pufferbedingungen und vor allem von der Agarosekonzentration ab. Sie erfolgt in Richtung der Anode. Das im Gel verteilte Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht diese unter UV-Licht-Bestrahlung intensiv orange fluoreszierend sichtbar.

Bei der Auswertung der Gele lassen sich drei Ereignisse beobachten: Der Proband ist für die ursprüngliche Basensequenz *homozygot*; oder er ist *heterozygoter* oder *homozygoter* Träger der Basen-Substitution (Abb. 2.5.). Die Allele des SNPs werden mit Allel 1 und Allel 2 bezeichnet, wobei es sich anbietet, das in der „Normalbevölkerung“ am häufigsten vorkommende Allel als Allel 1 zu definieren.

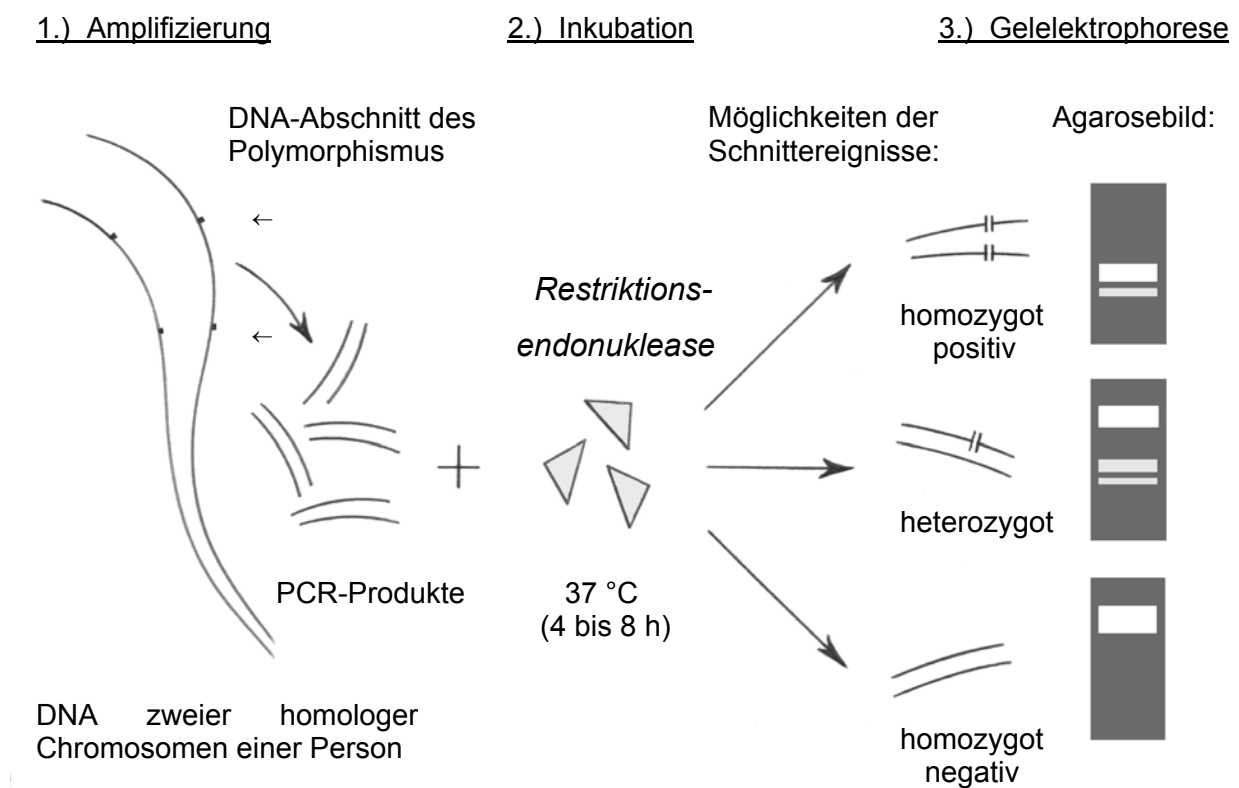


Abb. 2.5.: Schema einer SNP-Analyse. Wenn die DNA-Fragmente vom Restriktionsenzym in zwei unterschiedlich lange Teile geschnitten werden, zeigen sich bei Heterozygotie insgesamt drei Banden.



## 2.6. Generieren der Daten im Labor

Am Beginn der Genotypisierung der ca. 700 Personen stand die DNA-Extraktion. Nach Herstellung der Mutterplatten konnte die Auswertung größtenteils über die automatischen Arbeitsstationen des Labors bewerkstelligt werden. Zu diesen zählen beispielsweise die Pipettierroboter und das „Bar-Code“-System, das jede Arbeits/Mikrotiterplatte elektronisch erfasst. Zur Herkunft der im Labor benutzten Geräte, Chemikalien, Enzyme und zur Herstellung der Lösungen siehe Anhang A.5..

### 2.6.1. DNA-Extraktion

Am Beginn einer erfolgreichen genetischen Analyse steht die Präparation einer reinen und intakten DNA. Kontaminationen mit RNA, Polysacchariden (Heparin), Proteinen, Salzen oder Ethanol vermindern die Polymerase-Aktivität. Die EDTA-Blutproben wurden bis zur DNA-Extraktion in Tiefkühltruhen (-65/-20 °C) gelagert. Das Protokoll für die DNA-Extraktion stammt aus einer effizienten abgewandelten Version von „Nucleon“ (A.4.).

Am Ende der Extraktion erhielt man die sogenannte *Stock-DNA*, die in einem Eppendorfgefäß in 0,5 ml 1-fach TE bei pH 8,0 und – 20° aufbewahrt wurde.

### 2.6.2. DNA-Qualitätskontrolle

Vor dem Auftragen der DNA-Proben auf die Mutterplatte stellten wir von der *Stock-DNA* für jede Probe eine *Verdünnungs-DNA* (im Verhältnis 1 : 5) her:

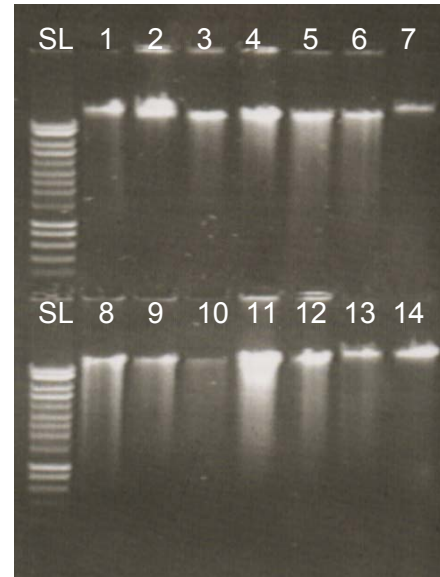
- D u r c h f ü h r u n g :
- 200 µl Stock-DNA + 800 µl dH<sub>2</sub>O
  - vorsichtig schütteln und anzentrifugieren
  - vor Weiterverarbeitung 24 h lösen lassen

Die Verdünnung testeten wir in einer Agarose-Gelelektrophorese. Ziel war es, die Qualität und Konzentration der DNA zu bestimmen und durch Nachextraktion oder Verdünnung einheitlich hochwertige DNA-Proben für die Herstellung der Template-DNA zu erhalten.

- D u r c h f ü h r u n g :
- Herstellung eines 0,7 % Agarose-Gels (s. Kap. 2.6.7.)
  - 1 x TAE-Puffer-Lösung in die Kammer geben
  - Pipettieren von 2,5 µl Verdünnungs-DNA mit 3 µl Stopmix und Auftragen des Gemisches in die Geltaschen
  - 2,5 µl SL-Leiter in je eine Geltasche pro Reihe geben

Der Smart Ladder (SL-Leiter) ermöglicht bei Kenntnis der aufgetragenen Menge eine Abschätzung der DNA-Konzentration. Im Allgemeinen lagen diese für die *Verdünnungs-DNA* im Bereich von 50 ng/μl und mehr. Bei einigen älteren Proben war die DNA degradiert.

2.6.: Darstellung der Kontrolle einer offensichtlich erfolgreichen DNA-Extraktion. Links ist der SL-Leiter aufgetragen, dessen erste Bande eine Konzentration von 50 ng/μl anzeigt. Den Proben 7 und 10 wurde weitere *Stock-DNA* zugegeben. Bei den anderen erfolgte eine Verdünnung mit dH<sub>2</sub>O. Verwendet wurde eine horizontale 16er Gelkammer und ein 0,7 % Agarose-Gel.



### 2.6.3. Erstellen von Mutterplatten, Verdünnungs- und Tochterplatten

Der Weg von der Mutterplatte zu ihren Tochterplatten beschreibt den letzten Präparationsschritt zum Erhalt einer *Template-DNA*.

#### 1. Mutterplatten:

In die einzelnen Senken der „Tief-Block-Platte“ gaben wir 500 μl *Verdünnungs-DNA* (ca. 50 ng/μl). Insgesamt wurden sieben Mutterplatten mit je 94 Probanden und zwei K3-Proben pro Platte hergestellt. Die Koordinaten der Proben auf der Mutterplatte gelangten für die Auswertung in die zentrale Datenverarbeitung.

#### 2. Verdünnungsplatten:

Von jeder Mutterplatte stellten wir mit Hilfe des „Igel“ (Pipettiersystem CybiWell™) zwei Platten mit einer 1 : 10 Verdünnung her. Neben einer erneuten Streckung der DNA-Menge erhielt man damit zwei Verdünnungsplatten, von denen aus je nach Bedarf Tochterplatten abpipettiert werden konnten. Die Mutterplatten fungierten als Reserven. Die einzelnen „wells“ der Verdünnungsplatten enthielten 200 μl gelöste DNA mit einer Konzentration von ca. 5 ng/μl.

### 3. Tochterplatten:

Für jede PCR eines Marker benötigt man eine Tochterplatte. Pro „well“ gab man auf diese Mikrotiterplatten zunächst 3 µl *Verdünnungs-DNA* und präparierte durch Trocknung bei Raumluft über 24 h somit 15 ng *Template-DNA* pro Probe. Wie die Mutter- und Verdünnungsplatten wurden die Tochterplatten im Gefrierschrank aufbewahrt.

#### 2.6.4. PCR-Ansatz und Programm zur Genotypisierung von tn62

Bei der Genotypisierung des Mikrosatelliten-Markers tn62 orientierten wir uns an den Literaturangaben von Lako und Mitarbeiter (1999):

Tab. 2.2.: Eigenschaften der Primer des Mikrosatelliten-Marker tn62:

Allel-Reichweite:	146 – 197 bp
Repetitive Sequenz:	(TC) <sub>10</sub> CCT(C) <sub>5</sub> -(TC) <sub>3</sub> -(C) <sub>3</sub> -TGCAA-(CA) <sub>15</sub> (CA) <sub>15</sub>
Forward-Primer:	5'-TCCAATCACCTCTGCTCACCTC-3'
Reverse-Primer:	5'-CTAGATTTTCATCCAGCCACAGG-3'

Pro Template-DNA von 15 ng wählten wir den PCR-Ansatz so, wie er in Tabelle 2.3. zusammen mit dem zugehörigen Mastermix für eine Tochterplatte und den Substratkonzentrationen angegeben ist. Bei der Optimierung des PCR-Ansatzes und der Cyclo-Programme galten die in Kap. 2.5.1. dargestellten PCR-Grundprinzipien. Insbesondere bedienen wir uns der Technik des „Kalt-Starts“: Der PCR-Ansatz wurde unter Eiskühlung pipetiert und in einem Kälteblock gehalten, während der Transfer-Roboter „Tecan“ den Mastermix auf die Template-DNA der Tochterplatten übertrug. Unspezifische Reaktionen der Taq-Polymerase vor dem Start der PCR sollten dadurch verhindert werden.

Abb. 2.7: Thermozykler-Programmierung AD100 („Annealing“-Temp. schattiert):

Step 1 = 94.0 degrees for 3 minutes.  
Step 2 = 94.0 degrees for 30 seconds.  
Step 3 = 61.0 degrees for 30 seconds.  
Step 4 = 72.0 degrees for 30 seconds.  
Step 5 = Goto step 2 for 2 more cycles.  
Step 6 = 94.0 degrees for 30 seconds.  
Step 7 = 59.0 degrees for 30 seconds.  
Step 8 = 72.0 degrees for 30 seconds.  
Step 9 = Goto step 6 for 2 more cycles.  
Step 10 = 94.0 degrees for 30 seconds.  
Step 11 = 57.0 degrees for 30 seconds.  
Step 12 = 72.0 degrees for 30 seconds.  
Step 13 = Goto step 10 for 2 more cycles.  
Step 14 = 90.0 degrees for 30 seconds.  
Step 15 = 55.0 degrees for 30 seconds.  
Step 16 = 72.0 degrees for 30 seconds.  
Step 17 = Goto step 14 for 30 more cycles.  
Step 18 = 72.0 degrees for 20 minutes.  
Step 19 = 16.0 degrees for ever.  
Step 20 = End.

Auch die Methode der „Touchdown-PCR“ diene einer Erhöhung der Spezifität. Hierbei handelt es sich um Cycler-Programme, die mit einer angehobenen „Annealing“-Temperatur beginnen und diese mit der Zahl der durchlaufenen Zyklen senken.

Als PCR-Programm für den TET-Marker tn62 benutzten wir den Algorithmus AD100 (Abb. 2.8.). Die PCR-Platten wurden mit einer Gummi-Matte abgedichtet und die Deckel der Peltier-Thermocycler-Blöcke mitbeheizt.

Tab. 2.3.: PCR-Ansatz und Mastermix für tn62

tn62	PCR-Ansatz pro Template-DNA (µl)	PCR-Mastermix pro Tochterplatte (µl)	Substrat-Lösungen [c]
Forward-Primer:	0,64	67,2	10 pmol/µl
Reverse-Primer:	0,64	67,2	10 pmol/µl
dNTP:	0,16	16,8	100 pmol/µl
dNTP-Puffer:	1,20	126,0	10x NH <sub>4</sub> , Mg <sup>++</sup> , pH 8,8
Taq-Polymerase:	0,08	8,4	5 U/µl
dH <sub>2</sub> O:	9,28	974,4	PCR-rein
insgesamt:	<u>12,00</u>	<u>1260,0</u>	

#### 2.6.5. PCR-Ansatz und Programm zur SNP-Analyse

Bei der Genotypisierung des Corneodesmosin-Polymorphismus 1243 hielten wir uns an das methodische Vorgehen von Ishihara (1996) und Tazi-Ahnini (1999). Die Amplifizierung des betreffenden DNA-Abschnittes erforderte zwei speziell ausgewählte Oligonukleotid-Primer (S15/S16), die im zweiten Exon des S-Gens auf Chromosom 6p liegen. Das resultierende PCR-Produkt hat eine Länge von 212 bp.

Der PCR-Ansatz pro Template-DNA von 15 ng sollte 15µl betragen (Tab. 2.4.). Das Volumen des

CDSN*1243	PCR-Ansatz pro Template-DNA (µl)
Forward-Primer	0,80
Reverse-Primer	0,80
dNTP	0,20
dNTP-Puffer	1,50
Taq-Polymerase	0,10
dH <sub>2</sub> O	11,60
insgesamt:	<u>15,00</u>

Tab. 2.4.: PCR-Ansatz pro Template-DNA für CDSN\*1243. (Die Konzentrationen der Substrate entsprechen denen von tn62.)

Master-Mixes für eine Tochterplatte errechnet sich wiederum durch Multiplikation mit 105 (Überschuss eingeplant). Bei der Pipettierung und Durchführung der PCR gingen wir analog der Beschreibung in Kap. 2.6.4. vor. Jedoch verlangten die Primer ein anderes Cycler-Programm: Abweichend von der initialen Hitze-Denaturierung von 4 min und der Abschluss-Elongation von 8 Minuten dauerten hier die Denaturierungs-, Annealing- und Synthesezeiten aller Zyklen je 20 Sekunden. Denaturierungs- und Elongationstemperatur betragen generell 94 bzw. 72 °C. Die Annealingtemperatur der ersten 6 Zyklen variierte von 63, 62, 61, 60, 59 auf 58 °C und war für die restlichen 29 Schritte gleichbleibend auf 57 °C festgelegt. Nach der Amplifizierung folgte die HphI-Inkubation der PCR-Produktes.

Name	Nukleotidposition	Primer	Anlagerungs-Temp.
S15	1112 – 1131	5'-CATTGCGTTCCAGCCAGTGG-3'	56 °C
S16*	1302 – 1323	5'-AACTGGAGCTGCTGCTGAAGGA-3'	

Tab. 2.5.: Oligonukleotid-Primer, die für die Amplifikation des polymorphen Abschnitts von Corneodesmosin benutzt wurden (\* Reverse-Primer).

## 2.6.6. Kapillar-Elektrophorese

### Vorbereitungen:

---

#### (1) Poolen der PCR-Produkte :

Um die 8 bis 10 Mikrosatelliten-Marker eines „Panels“ gleichzeitig in einem Kapillarelektrophorese-Lauf analysieren zu können, wurde zunächst mit dem „Pooling-Igel“ eine *Pooling-Platte* und von dieser eine *Verdünnungpooling-Platte* erstellt. Hierzu gaben wir die PCR-Produkte der Marker mit 5 µl pro „well“ equimolar auf eine gemeinsame Mikrotiterplatte und verdünnten 12 µl des „Poolings“ mit weiteren 10 µl dH<sub>2</sub>O. Bei der Zusammenstellung der *Panel* war darauf zu achten, dass die Allel-Reichweiten der Mikrosatelliten innerhalb eines Marker-Farbspektrums (FAM, TET, HEX) unterschiedlich waren.

#### (2) Herstellen einer Auftragsplatte:

Die Herstellung der Auftragsplatte bestand aus der Zugabe von 2 µl des Verdünnungspoolings auf eine mit 3 µl *Mega-Bace-Standard* bestückten Auftragsplatte. Zu beachten war hier, dass der Standard nur mit deionisiertem Formamid verdünnt wurde und dieser sehr lichtempfindlich war.

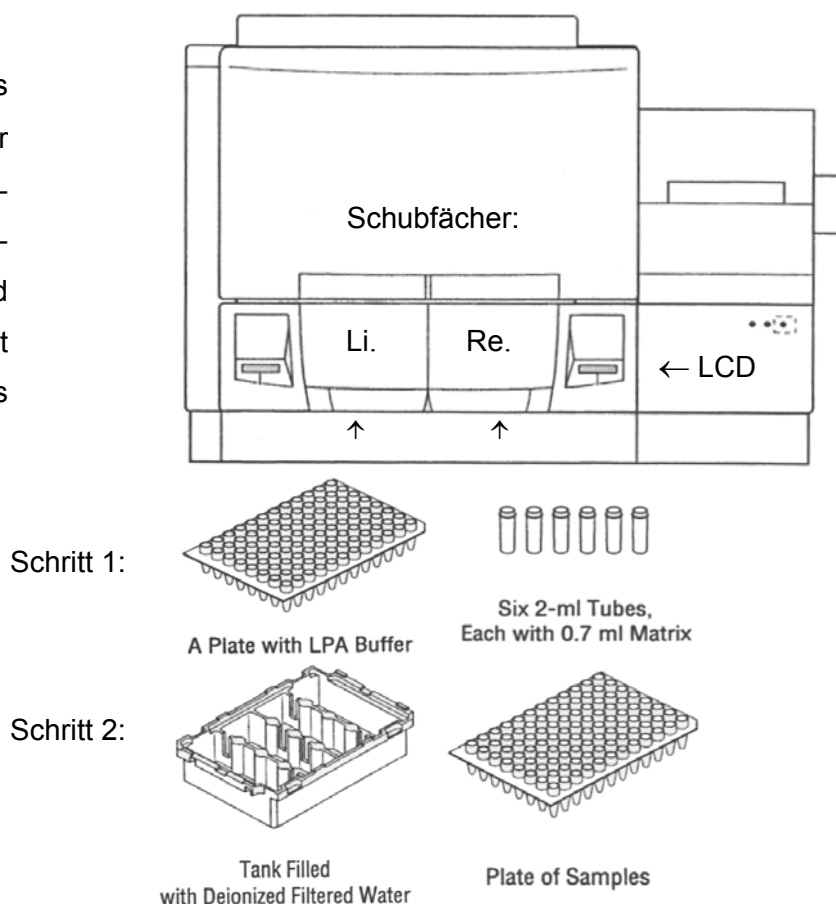
### (3) Vorbereitung der Gelmatrix und Pufferplatte:

Für jeden Elektrophorese-Lauf benötigt das Gerät sechs Tuben mit einer speziellen „linearen Polyacrylamid-Gelmatrix“ (MegaBace™ Long-read Matrix), die über eine Druckluftautomatik in die Kapillaren geladen wird. Um Inhomogenitäten des Gels zu beseitigen, zentrifugierte man die Tuben vor Gebrauch für vier Minuten mit 10.000 rpm. Außerdem wurde für jeden Lauf eine Pufferplatte mit 100 µl LPA-Puffer/Block pipettiert.

#### A b l a u f a m M e g a B a c e ™ :

Die Arbeitserleichterung bei der Kapillarelektrophorese ist dadurch gekennzeichnet, dass die Gelmatrix und der Inhalt der Auftragsplatte (PCR-Produkte und Längenstandard) automatisch in die Kapillaren übertragen wird. Nach Eingabe der *Panel*-Nummer und der Elektrophorese-Parameter im Instrument-Kontroll-Programm gaben zwei LCD-Anzeigen dem Gerätebediener entsprechende Informationen und Anweisungen zur Vorbereitung und zum Ablauf der Elektrophorese.

Abb. 2.8.: Darstellung des „MegaBace™“ und der zugehörigen Einschubelemente: Pufferplatte, Matrix-tuben, Wasserbehälter und Auftragsplatte (modifiziert aus der Anleitung des Gerätes).



### 1. Schritt: „Inject matrix and prerun“

- Ausstoß der alten Matrix aus den Kapillaren in eine zu verwerfene Pufferplatte
- Laden der neuen Matrix nach Einlegen der sechs zentrifugierten Matrixtuben
- Eingabe der neu pipettierten LPA-Puffer-Platte
- Nun: Denaturieren der Auftragsplatten-DNA (1 min, 94 °C), die Platte abdecken und auf Eis legen (cave: lichtempfindlich und Gefahr der Austrocknung)

### 2. Schritt: „inject samples and run“

- Nach einem kurzen Spülung („rinse tips“) mit Eingabe des dH<sub>2</sub>O-Gefäßes folgt die Injektion der PCR-Produkte von der Auftragsplatte in die Kapillaren.
- Erneute Spülung und Laden der aufbewahrten Pufferplatte

### 3. Schritt: „sample run in progress“

- Auf dem Monitor erscheint ein Elektrophorese-Laufbild, über das sich die Auftrennung in den Kapillaren beobachten lässt.
- Am Ende werden die Elektrophorese-Daten an den Auswertungsrechner transferiert.

## 2.6.7. Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Genotypisierung von CDSN\*1243 basierte auf der Agarose-Gel-Elektrophorese. Es sollten PCR-Produkte mit einer Länge von 89 bp bis 212 bp aufgetrennt werden. Dafür gossen wir Agarose-Gele mit einer Konzentration von 2 %. Für den Test von Nativ-DNA wurden 0,7 % Agarose-Gele benutzt.

### Herstellung der Gele:

---

- Abwiegen von 2 g bzw. 0,7 g Agarose in einer locker verschließbaren Glasflasche
- Dazu 100 ml 1-fach TAE geben
- Schlierenfreies Lösen der Agarose unter Schwenken und Erhitzen in der Mikrowelle
- Pipetieren von 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml TAE/Agarose unter dem Abzug
- Agarose-Gemisch ca. 10 min. abkühlen lassen und dann in der mit den Kämmen und Grenzblöcken vorbereiteten Gelkammer gut verteilt ausgießen

Die Beladung und der Lauf des Gels erfolgte wie in Kapitel 2.6.2. beschrieben. Das Bild der fluoreszierenden Banden wurde im UV-Transilluminator mit einer Kamera photodokumentiert. Für den SNP mussten wir Gele mit relativ großen Auftragstaschen verwenden (40er horizontale Gelkammern).

## 2.6.8. Restriktionsenzym-Analyse von CDSN\*1243

Nach der CDSN-PCR fand die Inkubation mit dem Restriktionsenzym statt. Der Nukleotidaustausch an Position 1243 ließ sich mit Hilfe des Restriktionsenzym Hph1 unterscheiden. In Abbildung 2.9. ist ein Teil der Nukleotidsequenz des Gens (Guerrin, 1998) mit dem polymorphen Abschnitt 1241 bis 1250 wiedergegeben.

Abb.2.9.: Ausschnitt aus dem Corneodesmosin-Gen (Position 1081 – 1381) mit Darstellung der Primer-Anlagerungsstellen (D6S15 bzw. 16) und Schnittprodukte (kursiv gedruckt):

---

D6S15 → ...

```

1081  tcatccccag ccagtcggca gcttcctcgg ccattgcggtt ccagccagtg gggactgggtg
1141  ggtccagct ctgtggaggc ggctccacgg gctccaaggg accctgctct ccctccagtt
1201  ctcgagtccc cagcagttct agcatttcca gcag ≠ cgccgg ttcaccctac catccctgcg
          Schnitt in zwei Fragmente ↑           ↑ Erkennungsstelle
  
```

SNP CDSN\*1243: Folge für die Inkubation:

5' – TTCACCCTAC – 3' → Hph1 schneidet (Serin)

Substitution von Cytosin zu → Hph1 schneidet nicht (Leucin)

Thymin an Position 1243 → TTA → Hph1 schneidet nicht (Leucin)

---

... ← D6S16

```

1261  gcagtgcttc ccagagcccc tgctccccac caggcaccgg ctccttcagc agcagctcca
1321  gttcccaatc gagtggcaaa atcatccttc agccttgtgg cagcaagtcc agctcttctg
1381  gtcacccttg catgtctgtc tcctccttga cactgactgg gggccccgat ggctctcccc
  
```

---

Das markierte Basentriplett TCA stellt im Produkt des Corneodesmosin-Gens die Aminosäuren-Position 394 dar und bildet den genetischen Code für Serin. Die Veränderung zu TTA ersetzt an dieser Stelle *Serin* mit *Leucin* (Ishihara et al., 1996). Allel 2 produziert zwei unterschiedlich lange Fragmente (123 bp + 89 bp), wohingegen Allel 1 das Fragment von 212 bp nicht schneidet (siehe auch Tab. 3.5. bzw. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### *Testinkubation:*

Vor der Analyse des Markers war zu bedenken, dass die heterozygoten Proben wegen der schwachen zweiten und dritten Bande im Agarose-Gel schwer erkennbar sein könnten. Daher stellte sich die Frage, ob bei der Agarose-Gel-Elektrophorese eine Beseitigung von



„Background“ nötig sein würde. Aus diesem Grund reinigten wir einige PCR-Produkte auf und verglichen sie nach einer Test-Inkubation mit den direkt inkubierten Schnittprodukten. Die Aufreinigung geschah für jede Probe einzeln in einem Eppendorfgeläß und umfasste zwei Wasch- und Fällungsschritte mit Essigsäure (3 M) und kaltem Ethanol (96 % und 70 %). Das resultierende Test-Gel zeigte jedoch, dass die Banden der heterozygoten Genotypen auch ohne den aufwendigen Zwischenschritt nachweisbar waren.

### Durchführung der Inkubation:

Zunächst stellten wir einen Mastermix aus Enzym, Enzym-Puffer und dH<sub>2</sub>O (Tab. 2.6.) her. Von diesem aus füllten wir mit dem „Tecan“ je 10 µl in die „Senken“ mehrerer leerer Mikrotiterplatten, auf denen der Inkubationsansatz durch einen Pooling-Schritt der PCR-Produkt (10 µl/well) vervollständigt wurde. Mit einem einfachen Temperatur-Programm (37°C über 6 h) inkubierten wir die Proben direkt in den Thermoblöcken der PCR-Geräte.

Hph1	Inkubationsansatz pro Probe (µl)
PCR-Produkte:	10,0
NE-Puffer (1x) :	2,0
Restriktionsenzym:	1,7
dH <sub>2</sub> O:	6,3
<b><u>Insgesamt:</u></b>	<b><u>20,0</u></b>

Tab. 2.6.: Hph1-Inkubationsansatz pro Probe. Wie Tazi-Ahnini und Mitarbeiter (1996) verwendeten wir einen Reaktionsansatz von 20 µl. Allerdings erhöhten wir die Enzym-Menge auf 8,5 U/µl.

<b>Hph I</b>	2,000 units - 5,000 U/ml
RECOMBINANT	Store at -20°C
<b>Recognition Site:</b>	
5' . . . G G T G A (N) <sub>8</sub> ▼ . . . 3'	
3' . . . C C A C T (N) <sub>7</sub> ▲ . . . 5'	
<b>Source :</b> An E. coli strain that carries the cloned <i>Hph I</i> gene from <i>Haemophilus parahaemolyticus</i> .	
Supplied in: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 µg/ml BSA, and 50% glycerol.	
<b>Reagents Supplied with Enzyme:</b> 10X NEBuffer 4.	
<b>Reaction Conditions:</b> 1X NEBuffer 4. Incubate at 37 °C.	

Abb. 2.10.: Information der Lieferpackung zur Handhabung von Hph1 und Angaben zu dessen Herkunft.

## Durchführung der Elektrophorese:

Die Herstellung, Beladung und Auswertung der Gele erfolgte manuell. Man verwendete ein 2 % Agarose-Gel, wobei wir für jede Mikrotiterplatte 2 ½ Gelkammern bearbeiteten (insgesamt 18 Gele). Vor dem Befüllen der Geltaschen wurden zu jeden 20 (+/- 2) µl einer Probe weitere 5 µl Stop-Mix zugemischt. In die Taschen gab man dann 20 µl der so angefärbten Inkubationsprodukte. Am Rand einer Reihe wurde als Längenmarker ein kb-Leiter aufgetragen (3,5 µl). Die Laufzeit der Gele betrug bei ca. 100 mA und 100 mV im Durchschnitt 50 Minuten.

### 2.6.9. Erfassung der Rohdaten und Datenverarbeiten

Für die Erfassung der Genotypisierungsdaten wurden alle Probanden in einer *Pedfile-Datei* erfasst. Jede einzelne Probe besaß eine vierstellige Kennzahl. Das Geschlecht, die Familienposition (Vater, Mutter, Indexperson bzw. Kind) und der Krankheitsstatus (betroffen, nicht-betroffen) wurden analog nach dem Beispiel von Abb.2.12. codiert.

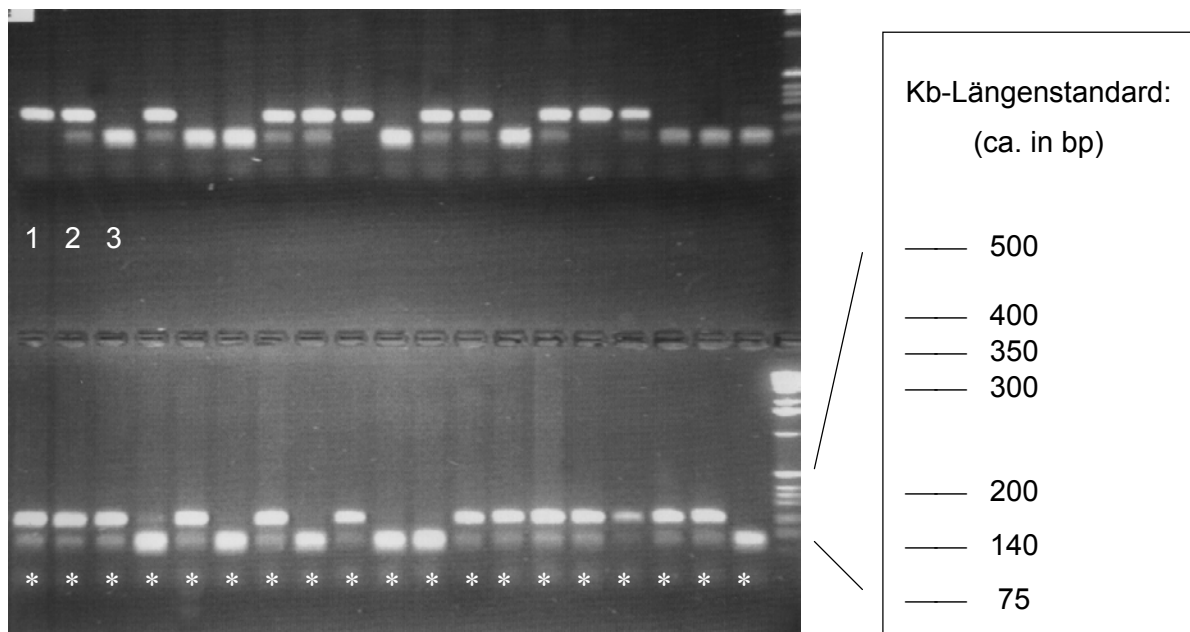


Abb. 2.11.: Dokumentation von Gel L (Mutterplatte 5). Rechts aufgetragen ist der kb-Längenstandard, dessen Angabe ungefähr mit den Fragmenten der Schnittprodukte (212, 123 und 89 bp) übereinstimmt. Zwar ist die dritte SNP-Bande nicht separat zu erkennen (\*Primer-Überschuss), jedoch sind die Genotypen gut feststellbar. Beispiel oben links: (1) ~ homozygot für Allel 1, (2) ~ heterozygot, (3) ~ homozygot für Allel 2 (vergleiche Abb. 2.5. und Tab. 3.5.).

Beim SNP sind die Genotypen wie in Abbildung 2.11. dargestellt direkt aus dem Gelbild ersichtlich. Nach Festlegung der Allele (Tab. 3.5.) wurden sie im jeweiligen Zahlencode in die Datei eingetragen.

Die Nummerierung der Allele eines Mikrosatelliten richtet sich nach der Länge der polymorphen Abschnitte. Diese Angabe erhielt man über die Software des Kapillarsequenzierers („Genetic Profiler v1.0“). Voraussetzung war das korrekte *Labeln* der Allelkurven: Die Detektionssignale ergaben charakteristische Fluoreszenz-Kurven in Abhängigkeit von der Farbmarkierung und Mikrosatelliten-Art (Mono-, Di-, Tri-, Tetranukleotide). Bei der Auswertung hatte man sich zuvor darauf zu einigen, an welche Stelle des Musters der für die Längenberechnung relevante Peak hingehören sollte. Folglich wurden bei heterozygoten Probanden zwei Allel-Peaks markiert, bei Homozygoten nur ein Allel. Zum Teil war eine automatische Mustererkennung durch das Programm möglich. Als Mononukleotid-Marker musste tn62 jedoch rein manuell „gelabelt“ werden. Wir fanden insgesamt 21 verschiedene Allele, die entsprechend nummeriert in die *Pedfile-Datei* eingetragen wurden.

Trio	Probe	Eltern		Geschlecht*	Status**	CDSN*1243		tn62	
9123	9123	0	0	1	2	1	2	4	18
9123	9125	0	0	2	1	1	2	7	20
9123	9124	9123	9125	1	2	2	2	4	7
9126	9126	0	0	1	2	1	2	10	16
9126	9128	0	0	2	1	2	2	1	10
9126	9127	9126	9128	2	2	2	2	10	10

Abb. 2.12.: Beispiel zweier alleltypisierter Trios in der Pedfile-Datei. (\*1 ~ männlich/ 2 ~ weiblich; \*\*1 ~ betroffen/2 ~ nicht betroffen). Der SNP CDSN\*1243 stellt einen „biallelischen“ Marker dar. Tn62 besitzt als Mikrosatellit eine größere Anzahl von Allelen. (Die CDSN-Allele der beiden Trios entsprechen nicht der Abb. 2.11.).

## 2.7. „Mendel-Check“

Mit dem Begriff „Mendel-Check“ ist gemeint, dass die Allele aller Marker auf eine korrekte Vererbung innerhalb der Familien überprüft werden. Aus zwei Gründen tauchten hier ab und zu Unstimmigkeiten mit den Mendel'schen Regeln auf:

- (1) Die untersuchten vermeintlichen Angehörigen sind in Wirklichkeit nicht miteinander verwandt. Besonders häufig kommt der Fall „Non-Paternität“ vor, d. h. dass der Vater entgegen den Angaben der Familie eben nicht der Vater des Kindes ist. In diesem Fall musste die nicht passende Person aus der Untersuchung herausgenommen werden. Dadurch gingen der Studie mehr als 5 % der gesammelten Familien verloren.
- (2) Bei den Mikrosatelliten kam es beim *Labeln* gelegentlich zur Aufstellung fehlerhafter Genotypen. Diese konnten jedoch meist mit Hilfe der „Kreuz-Referenz“ im Stammbaum korrigiert werden. Als Anhaltspunkt galt die Plausibilität der Mendel'schen Vererbung.

Der Mendel-Check wurde mit einem Computer-Programm durchgeführt, dessen Algorithmus alle Genotypen auf Vererbungs-Inkompatibilitäten kontrollierte. Bestanden die Daten diesen *PedCheck* (Jeffrey und Weeks, 1998), wurden sie dem TDT zugeführt.

## 2.8. Transmissions/Disequilibrium-Test (TDT)

Wir verwendeten für den „Test auf Kopplungsungleichgewichte“ speziell die Methode des *RC-TDT* (reconstruction-combined transmission/disequilibrium, Knapp, 1999). Auch ein multiallelischer Test mit dem *FBAT* (family based association test, Horvath and Laird, 2000) wurde durchgeführt. Als Grundlage der Programme diente im „Institut für Bioinformatik Bonn“ das *SAS-Statistik-Paket*. Die statistische Methode bei der Suche nach einem geschlechtsspezifischen Transmissionseffekt übernahmen wir von Bennett und Mitarbeiter (1997) (s. Kap. 3.5. und 3.7.).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung des Datensatzes

In diesem Abschnitt werden die quantitativen und qualitativen Eigenschaften der Bevölkerungs-Stichprobe dargestellt.

#### 3.1.1. Datensatzgröße

Zunächst liegt ein Datensatz vor, der sich aus 671 Personen aus 210 Familien zusammensetzt. In dieser Gruppe ist jedoch bei 11 Trios die Indexperson nicht eindeutig definiert, so dass diese Trios keine Falk-Rubinstein-Trios (Falk und Rubinstein, 1987) darstellen.

Damit verbleiben für die Auswertung 199 Familien mit insgesamt 628 Personen. Im Einzelnen handelt es sich um 172 Trios, 24 Familien mit 4 Personen, 2 Familien mit 5 Personen und einer Familie mit 6 Personen (Tab. 3.1.).

Familien-Art:	Anzahl:
Einfache Trios	172
Familien mit 4 Personen	24
Familien mit 5 Personen	2
Familien mit 6 Personen	1

Summe: 199

Tab. 3.1.: Zusammensetzung und Größe des Datensatzes, der für die Berechnung des RC-TDT benutzt wird. Die ursprüngliche Trio-Anzahl von 210 Familien wurde um 11 Trios reduziert.

#### 3.1.2. Zahl der Betroffenen

Von den 628 Personen sind 328 Individuen als „krank“ (von Psoriasis vulgaris betroffen) und 276 als „gesund“ (nicht-betroffen) eingestuft worden. Bei 24 Teilnehmern ist die Diagnose unklar, wobei hier die 21 nicht angetroffenen Elternteile der unvollständigen Trios mitgezählt sind, bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um *gesunde* Angehörige handelt.

Diagnose:	Absolut:	%
Psoriasis	328	52,2
Keine Psoriasis	276	44,0
Unbekannt	24	3,8
Summe:	<u>628</u>	<u>100</u>

Tab. 3.2.: Häufigkeit der Psoriasis-vulgaris-Träger in der Studiengruppe. Bei den mit „Diagnose unbekannt“ eingeordneten Personen handelt es sich zum großen Teil um die fehlenden Elternteile der unvollständigen Trios.

Betrachtet man die Gesamtheit der Studienteilnehmer ist die Frage angebracht, ob bei den Personen mit Psoriasis vulgaris Männer und Frauen in etwa gleich häufig vorkommen. Abbildung 3.1. zeigt wie erwartet eine ausgeglichene Verteilung.

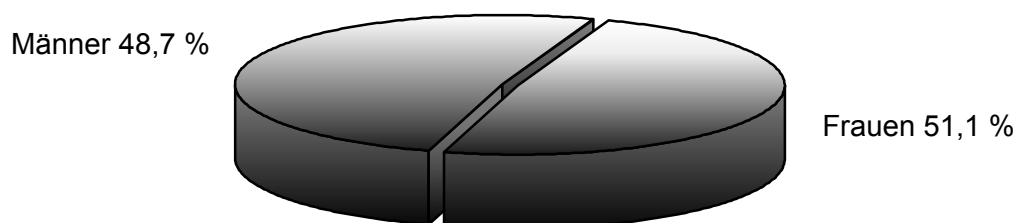


Abb. 3.1.: Verhältnis von betroffenen Männern zu betroffenen Frauen. Die Stichprobe von 328 Individuen zeigt keine auffällige Abweichung von der Normalbevölkerung, in der Männer und Frauen fast gleich häufig erkranken (Lomholt, 1963).

### 3.1.3. Mittleres Erkrankungsalter

Das Erkrankungsalter beim erstmaligen Auftreten von Psoriasis vulgaris („Age of Onset“) liegt nach den Angaben der Betroffenen durchschnittlich bei rund 12 Jahren. Es bezieht sich nur auf die Indexpersonen und charakterisiert unsere Patientengruppe ganz eindeutig als frühmanifestierende „Typ1“-Psoriasis (Christophers und Henseler, 1989).

### 3.1.4. Herkunft der Familien

Um eine möglichst große Patientengruppe analysieren zu können, wurden 26 Familien aus Brandenburg mit in die Untersuchung einbezogen. Der Großteil (n = 173) Teil der Familien ist jedoch von Münster aus rekrutiert worden und kann als Gruppe „westfälischen Ursprungs“ bezeichnet werden. Dabei wurde bewusst darauf geachtet, dass Familien mit offensichtlichen Vorfahren aus anderen Ländern (Türkei, Italien, Polen, u.a.) nicht von uns angesprochen wurden, denn für Kopplungsungleichgewichts-Studien bietet eine ethnisch homogene Population einige wesentliche methodische Vorteile.

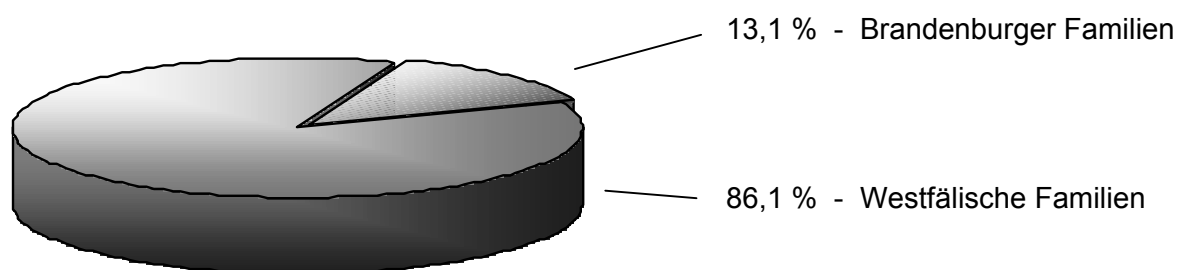


Abb. 3.2.: Aufteilung der Studiengruppe nach Herkunft der Familien. Von 199 Familien stammen 26 Trios aus Brandenburg.

### 3.1.5. Triokonstellation

Nach der Konstellation der Betroffenen in den Familien lassen sich direkt familiäre, indirekt familiäre, sporadische und unklare Trio-Arten unterscheiden (Kap. 2.2.). Den mit ca. 88 % größten Teil stellen jedoch die Trios dar, bei denen außer bei der Indexperson auch in der weiteren Familie Psoriasis vulgaris aufgetreten ist (Tab 3.3.).

Triokonstellation:	Absolut:	%
Direkt familiär	114	57,3
Indirekt familiär	61	30,7
Sporadisch	19	9,5
Unklare Fälle	5	2,5
Summe:	<u>199</u>	<u>100</u>

Tab. 3.3.: In der Tabelle sind die Trios nach der Konstellation der Betroffenen in der Familie aufgeteilt. Der Anteil der sporadischen Psoriasis-Trios ist gegenüber den direkten und indirekten familiären Trios mit 9,5 % gering.

### 3.2. Genotypisierungsrate

Die labortechnische Bestimmung der Genotypen geschah bei CDSN\*1243 zu mehr als 98 % und bei TN62 zu 96 %. Die Genotypisierungsrate insgesamt liegt jedoch etwas niedriger, da auch die Elternteile, von denen keine Blutprobe vorhanden war, formal als nicht genotypisiert gezählt wurden. Für CDSN\*1243 liegt die Rate dann bei rund 94 % und für TN62 bei 91 %.

Marker:	Typisierungsausfälle:	% (von 628)
CDSN*1243	38	94,0
TN62	56	91,1

Tab. 3.4.: Genotypisierungsrate pro Marker in Bezug auf die gesamte Gruppe.

### 3.3. Häufigkeit und Verteilung der Allele von CDSN\*1243

Bei der Bestimmung der Genotypen von CDSN\*1243 anhand der Agarose-Gele wurde das positive Hph1-Schnittereignis mit Allel 2 bezeichnet (Tab. 3.5.).

Base an Position 1243	AS an Position 394	Schnittereignis	Allel-Bezeichnung
Thymin	Leucin	Hph1 negativ	Allel 1
Cytosin	Serin	Hph1 positiv	Allel 2

ab. 3.5.: Übersicht zu den Zusammenhängen des Corneodesmosin-Polymorphismus und Festlegung der Allelbezeichnung

Tazi-Ahnini und Mitarbeiter (1999) benennen der Standard-Nomenklatur nach das in ihrer Kontrollgruppe am häufigsten vorkommende Allel mit Allel 1 und das Seltene mit Allel 2. Wie sind Allel 1 und Allel 2 in unserer Studiengruppe verteilt? Gibt es hier bereits einen offensichtlichen Unterschied von Betroffenen zu Nicht-Betroffenen? Es lassen sich folgende von der Trio-Struktur der Stichprobe unabhängige Gruppen zusammenstellen:

- **Gruppe 1:** Probanden mit vermutlich geringer genetischer Prädisposition zu Psoriasis vulgaris ~ Alle nicht betroffenen Elternteile aus den direkt familiären und sporadischen Trios (Nicht enthalten: Eltern aus den indirekt familiären Trios)



- **Gruppe 2:** Probanden mit Psoriasis vulgaris Typ1 ~ Alle betroffenen Eltern (nicht deren Kinder) aus den direkt familiären Trios und alle betroffenen Kinder aus den indirekt familiären Trios
- **Gruppe 3:** Probanden mit nicht familiärer Psoriasis vulgaris ~ Alle Betroffenen aus den sporadischen Trios

Zwar kann Gruppe 1 nicht als eine Stichprobe aus der Normalbevölkerung gelten, jedoch ist sie mit einer „Kontrollgruppe ohne Psoriasis“ annähernd vergleichbar. Sehr knapp überwiegt bei diesen 253 Elternteilen Allel 1 mit 50,2 %. Dennoch erscheint unsere Vergabe der Allel-Bezeichnung als gerechtfertigt. Ein deutlicher Unterschied zeichnet sich gegenüber Gruppe 2 ab, in der Allel 2 mit 62,5 % überwiegt. Bei den betroffenen Kinder aus den sporadischen Trios zeigt sich gegenüber den Betroffenen der familiären Trios wiederum eine erhöhte Allel-1-Frequenz. Zu berücksichtigen ist jedoch die geringe Zahl der Probanden aus den sporadischen Trios.

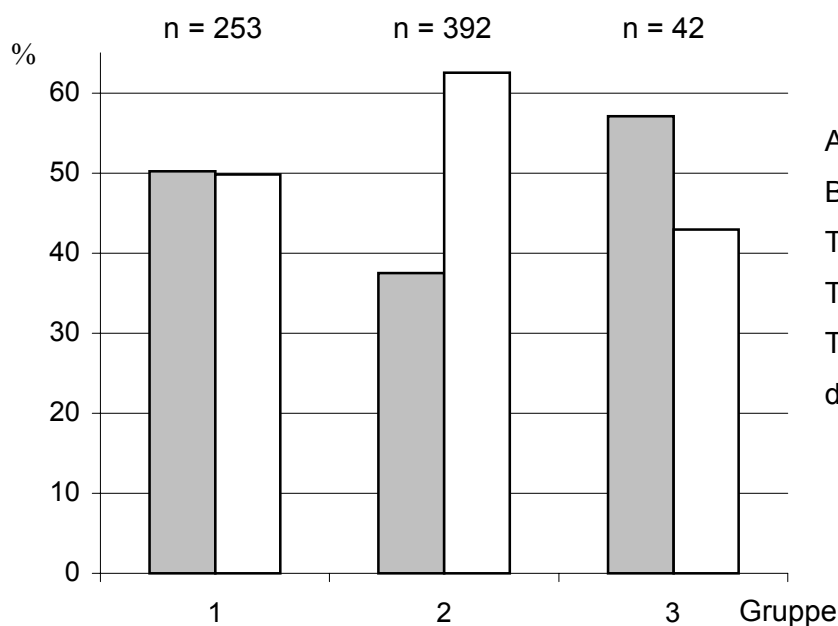


Abb. 3.3.: Verteilung der Allele bei den Nicht-Betroffenen, den Psoriasis-Trägern aus den familiären Trios und den Psoriasis-Trägern aus den sporadischen Trios:  
 Allel 1 ~ grauer Balken  
 Allel 2 ~ heller Balken

Gruppe:	Häufigkeit von Allel 2	%
1 (keine Psoriasis)	126 von 253	49,8
2 (familiäre Psoriasis)	245 von 392	62,5
3 (sporadische Psoriasis)	18 von 42	42,9

### 3.4. Heterozygotie und PIC-Werte der Marker

Beim Vergleich der TDT-Werte der beiden Marker sollte deren Aussage-Kraft anhand der PIC-Werte (polymorphism information content) berücksichtigt werden (Tab. 3.7.).

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n p_i^2 p_j^2$$

( $p_i$  ~ Häufigkeit des i-ten Allels)

Der PIC-Wert errechnet sich aus den Häufigkeiten der Allele in der Normalbevölkerung (Strachan, 1998). Zu berücksichtigen ist, dass die Allelhäufigkeiten der Indexpersonen und ihrer Eltern nicht unabhängig voneinander sind.

- Für CDSN\*1243 ergibt sich in der Gruppe der Normalbevölkerung (s. Kap. 3.3.) eine Allel-Frequenz von 0,50 für Allel 2. Damit beträgt die Heterozygotie des Markers ebenfalls 50 %, und dessen PIC-Wert liegt bei **0,375** (Tab. 3.7.).
- Der Mikrosatelliten-Marker TN62 besitzt im Gegensatz zur Literaturangabe (Lako et al., 1998) bei unseren Familien statt 14 insgesamt 21 verschiedene Allele. Es handelt sich hier um einen unregelmäßigen Dinukleotid-Basenmarker. Die Frequenzen der wichtigsten Allele sind in Tabelle 3.6.(b) aufgeführt. Somit liegt auch der Heterozygotie-Wert von ca. 92 % ebenfalls höher (Lako et al.: 82,4 %). Im Vergleich zu CDSN\*1243 weist der Marker einen deutlich besseren PIC-Wert von **> 0,94** auf.

### 3.5. Ergebnis des TDT

Bei der Methode des *RC-TDT* (reconstruction-combined transmission/disequilibrium test, Knapp, 1999) handelt es sich um einen Test für „biallelische Marker“, bei dem man das interessierende Allel untersucht und *exakte p*-Werte erhält. TN62 weist als Mikrosatelliten-Marker weit mehr als zwei Allele auf. Um herauszufinden, welches Allel mit der Krankheit assoziiert ist, führten wir als erstes eine Analyse mit dem *FBAT* (family based association test, Horvath and Laird, 2000) durch. Hier wurde jedes Allel getestet und der *asymptotische p*-Wert zum zugehörigen Z-Wert (N(0,1)-verteilt) ausgegeben. War der *p*-Wert kleiner als 0,05, so haben wir mit diesem Allel den *RC-TDT* durchgeführt, um einen *exakten p*-Wert zu erhalten. Diese biomathematischen Analysen wurden dankenswerterweise am *Institut für medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn* (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Wienker) durchgeführt.

Die verbliebenen signifikanten Allele finden sich in Tabelle 3.6. (b) mit der Angabe des Allels, der Allelfrequenz, der Anzahl der informativen Familien, des *Z*-Werts, des *asymptotischen* und des *exakten p*-Werts. Negative *Z*-Werte bedeuten, dass das Allel protektiv für Psoriasis ist, positive, dass es suszeptibel ist. Ferner wurde für TN62 mittels *FBAT* ein multiallelischer Test durchgeführt. Mit der Anzahl der Allele, dem  $\chi^2$ -Wert und dem zugehörigen Freiheitsgrad (*df*) findet sich dessen *p*-Wert in Tabelle 3.6. (c).

Tab. 3.6. (a): Ergebnis für CDSN\*1243

Marker	Allel	Frequenz	# inform. Fam.	Z-Wert	<i>p</i> asymptotisch	<i>p</i> exakt
CDSN*1243	2	0,59	137	2,701	0,0069	0,0084

Tab. 3.6. (b): Signifikante Ergebnisse für TN62

Marker	Allel	Frequenz	# inform. Fam.	Z-Wert	<i>P</i> asymp.	<i>p</i> exakt
TN62	1	0,11	59	-2,095	0,036	0,047
TN62	4	0,099	57	4,947	1,0x 10 <sup>-6</sup>	6,2x 10 <sup>-7</sup>
TN62	6	0,066	44	-2,188	0,029	0,04

Tab. 3.6. (c): Ergebnis des multiallelischen Tests (*FBAT*) für TN62

Marker	# Allele	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>
TN62	21	45,28	20	0,001

Für die Interpretation der Ergebnisse sind die exakten *p*-Werte ausschlaggebend: Die Untersuchung des Datensatzes zeigt, dass sowohl CDSN\*1243 als auch TN62 mit Psoriasis vulgaris assoziiert sind: Der RC-TDT von CDSN\*1243 ergibt eine signifikant häufigere Transmission von Allel 2, das, wie sich bereits in Abbildung 3.3. zeigt, in der Gruppe der Psoriasis-Typ1-Betroffenen häufiger vorkommt als bei den Nicht-Betroffenen. Der exakte *p*-Wert von TN62 liegt bei Allel 4 im hochsignifikanten Ergebnisbereich.

Im Vergleich mit CDSN\*1243 zeigt TN62 wesentlich signifikantere *p*-Werte. Der Unterschied relativiert sich jedoch, wenn man die PIC-Werte der Marker berücksichtigt. Für den „biallelischen Marker“ CDSN\*1243 sind gegenüber dem Mikrosatelliten-Marker TN62 auch „schwächere“ *p*-Werte zu erwarten.

Marker	<i>p</i> -Wert	PIC-Wert
CDSN*1243	0,0084 (Allel 2)	0,375
TN62	6,2x 10 <sup>-7</sup> (Allel 4)	> 0,94

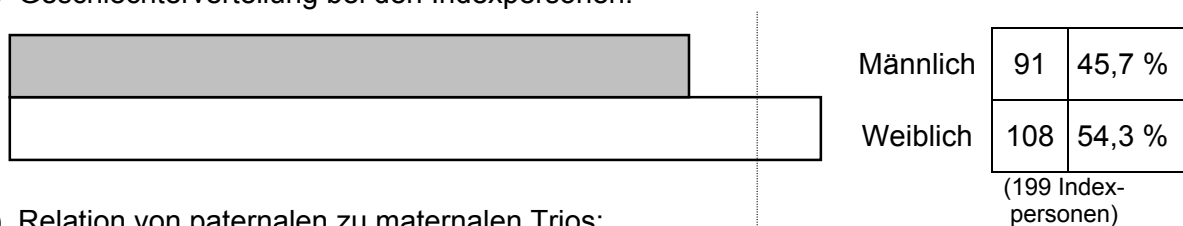
Tab. 3.7.: Vergleich der *p*-Werte der Marker in Gegenüberstellung zu ihren PIC-Werten.

### 3.6. Maternale versus paternale Vererbung von Psoriasis vulgaris

Die Auswahl der 199 Trios hat nach dem Zufallsprinzip stattgefunden. Weder das Geschlecht der Indexperson noch die Transmission vom Vater oder von der Mutter war ein Selektionskriterium. Daher veranschaulicht Abbildung 3.4. wie erwartet, dass folglich insgesamt ungefähr gleich viele Frauen wie Männer mit Psoriasis vulgaris in der Stichprobe enthalten sind.

Trifft diese 50%-Aufteilung auch zu, wenn man die betroffenen Indexpersonen allein betrachtet? Auch stellt sich die Frage, ob bei den 114 direkt familiären Trios ebenso viele maternale wie paternale Trios gesammelt worden sind? Abbildung 3.4. (a, b) deutet hier gewisse Unterschiede an:

(a) Geschlechterverteilung bei den Indexpersonen:



(b) Relation von paternalen zu maternalen Trios:

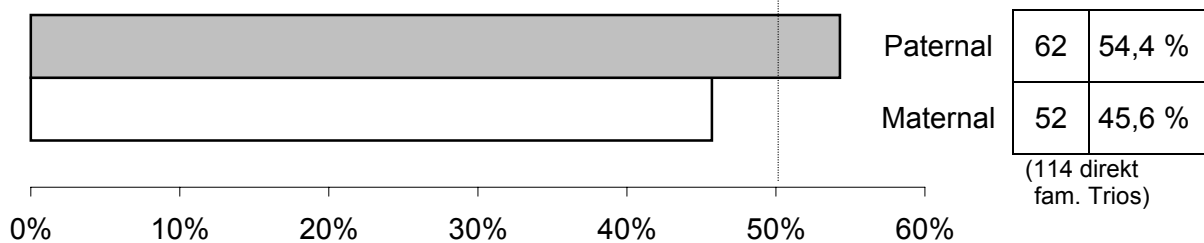


Abb. 3.4. a und b: Das Balkendiagramm veranschaulicht, dass bei den Indexpersonen das weibliche Geschlecht überwiegt, während insgesamt mehr paternale Psoriasis-Trios (Vater betroffen) gesammelt worden sind. Die jeweiligen Abweichung von der 50%-Verteilung sind jedoch nicht signifikant.

Tendenziell wurden die Trios häufiger über weibliche als über männliche Indexpersonen rekrutiert, wobei dies vielleicht mit der Ansprechbarkeit der zu rekrutierenden Indexperson zusammenhängt. Andererseits zeigt sich auch ein leichtes Überwiegen der paternalen gegenüber den maternalen Trios, wobei diese Abweichung hier ebenfalls nicht signifikant ist.

Die weitere Aufteilung der Trios führt zu einer genaueren Betrachtung: Tabelle 3.8. schlüsselt den Datensatz danach auf, wie viele maternale Trios mit Index-Söhnen und wie viele maternale Trios mit Index-Töchtern gesammelt worden sind. Die gleiche Auszählung wurde bei den paternalen Trios vorgenommen (paternale Trios mit Söhnen und paternale Trios mit Töchtern). Die Tabelle liest sich von links nach rechts und von oben nach unten:

- Während bei den paternalen Trios Söhne und Töchter als Indexpersonen gleich häufig vorkommen (31 zu 31), findet man bei den maternalen Trios, bei denen ungefähr das gleiche Verhältnis von Söhnen zu Töchtern erwartet werden sollte, männliche Indexpersonen seltener als weibliche Indexpersonen (16 zu 36;  $\chi^2 = 7,692$ ;  $p = 0,0056$ ).
- Zum Zweiten erkennt man, dass sich bei der Betrachtung der Index-Sohn-Familien ein signifikantes Überwiegen der paternalen Trios ergibt (31 zu 16;  $\chi^2 = 4,79$ ;  $p = 0,029$ ). Bei den Töchtern allein herrscht andeutungsweise eine Tendenz in die entgegengesetzte Richtung (31 zu 36).
- Zur Beantwortung der Frage, ob die insgesamt von der Erwartung abweichende Verteilung in der Tabelle statistisch signifikant ist, lässt sich der  $\chi^2$ -Unabhängigkeits-Test anwenden. Dieser ergibt einen signifikanten  $p_{het.}$ -Wert von  $0,0378$  ( $\chi^2_{het.} = 4,316$ ; 1 df).

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist nicht einfach (s. Kap. 4.2.).

Tab. 3.8.: Untersuchung des Geschlechts der Indexpersonen unter dem Aspekt maternaler/paternalen Vererbung von Psoriasis vulgaris bei 114 direkt familiären Trios.

<b>Index. Trio</b>	<b>Sohn</b>	<b>Töchter</b>	<b>% Sohn</b>	<b>P</b>
<b>Maternal</b>	16	36	30,8	<i>0,0056</i>
<b>Paternal</b>	31	31	50,0	<i>1,00</i>
<b>% paternal</b>	66,0	46,3	$\chi^2_{het.}$ <b>p-Wert</b>	
<b>P</b>	<i>0,029</i>	<i>0,54</i>		

Die maternalen Trios mit betroffenen Söhnen erscheinen im Vergleich zu den anderen Trio-Konstellationen zahlenmäßig unterrepräsentiert. Daraus ergeben sich signifikante Unterschiede der Konstellationen zueinander, die insgesamt auch vom  $\chi^2$ -Unabhängigkeits-Test ( $\chi^2_{het.} = 4,316$ ;  $p_{het.} = 0,0378$ ; 1 df) bestätigt werden.

### 3.7. Maternale versus paternale Transmission der Allele

Bei der Suche nach einem geschlechtsspezifischen Effekt bei der Transmission der Allele von CDSN\*1243 und TN62 gehen wir wie Bennett und Mitarbeiter (1997) vor. Man zählt die Transmissionsereignisse getrennt nach maternaler und paternaler Herkunft aus und stellt die Zahlen in einer Vier-Felder-Tafel einander gegenüber (2 x 2 Kontingenz-Test auf Heterogenität). Die Abweichung von der erwarteten Verteilung (50 %) lässt sich mit Hilfe der  $\chi^2$ -Statistik auf Signifikanz prüfen. Gegenüber dem TDT verringert sich für diese Analyse die Summe der informativen Familien um die Anzahl der Trios, in denen sich die Transmissionen der Allele nicht genau dem Vater oder der Mutter zuordnen lassen.

#### (1) **Corneodesmosin:**

Für CDSN\*1243 konnten 114 informative Trios mit insgesamt 130 phasendefinierten Transmissionen in die Analyse eingehen. Vergleicht man die beiden Transmissions-Anteile von Allel 2 („% t Allel 2“) für Mütter und Väter, so scheint zunächst das paternale Transmissions-Ungleichgewicht verhältnismäßig gegenüber dem Maternalen zu überwiegen (Tab. 3.9. a.). Die jeweiligen *P*-Werte weisen einen Größenunterschied von mehr als einer Potenz auf. Dennoch, der Heterogenitäts-Test ergibt für den Unterschied der paternalen und maternalen Transmissions-Verteilung kein signifikantes Ergebnis ( $\chi^2_{het.} = 1,035$ ; 1 df;  $p_{het.} = 0,31$ ).

CDSN*1243	Allel 1	Allel 2	% t Allel 2	p-Wert	$\chi^2$ het. p-Wert
<b>Maternal</b>	25	44	63,8	0,023	0,31
<b>Paternal</b>	17	44	72,1	0,00055	

Tab. 3.9-a: Maternale versus paternale Transmissionen von Allel 2 auf Kinder mit Psoriasis vulgaris bei CDSN\*1243.

Im Datensatz lässt sich tendenziell ein Überwiegen der paternalen Transmissionen erkennen. Dieser Hinweis auf einen *paternalen Transmissionseffekt* im Corneodesmosin-Gen ist nicht signifikant.

Stratifizierung:

In den Untergruppen zur getrennten Betrachtung nach dem Geschlecht der Indexperson (Tab. 3.9. b – c) ergibt sich kein auffallender Unterschied im Vergleich zum Ergebnis der Gesamtgruppe:

Tab. 3.9-b:

Söhne:	Maternal	Paternal
Allel 1	15	8
Allel 2	18	16
% t Allel 2	54,6	66,7
<i>P</i>	0,60	0,10
$\chi^2$ het. <i>p</i> -Wert	0,36	

Tab. 3.9-c:

Töchter:	Maternal	Paternal
Allel 1	10	9
Allel 2	26	28
% t Allel 2	72,2	75,7
<i>P</i>	0,0077	0,0018
$\chi^2$ het. <i>p</i> -Wert	0,74	

Tab. 3.9. (a – c): Maternale versus paternale Transmissionen von Allel 2 auf Kinder mit Psoriasis vulgaris: (a) Alle Indexpersonen, (b) Söhne getrennt, (c) Töchter getrennt. Weder bei den Söhnen noch bei den Töchtern ergibt sich ein paternaler Transmissionseffekt von Allel 2, der sich aber in der Gesamtgruppe sehr diskret andeutet (Tab. 3.9-a).

## (2) TN62:

Für TN62 ergibt sich aus der wie bei CDSN\*1243 erfolgten Analyse ein entgegengesetztes Ergebnis. Zur Auswertung kommen 55 Trios mit 56 phasendefinierten Transmissionen (Tab. 3.10-a.): Bei Müttern wird Allel 4 25mal transmittiert und Nicht-Allel 4 nur 2mal; eine paternale Transmission von Allel 4 gibt es bei 23 Trios und von Nicht-Allel 4 bei 6 Trios. Obwohl der *P*-Wert bei maternalen Trios offensichtlich um wenigstens zwei Potenzen signifikanter ist, ergibt der  $\chi^2$ -Unabhängigkeitstest einen *p*<sub>het.</sub>-Wert von 0,16 ( $\chi^2_{\text{het.}} = 2,02$ ; 1 df):

TN62	Allel 4	Nicht Allel 4	% t Allel 4	<i>P</i>	$\chi^2$ het. <i>p</i> -Wert
Maternal	25	2	92,6	$0,96 \times 10^{-5}$	0,16
Paternal	23	6	79,3	0,00159	

Tab. 3.10-a: Maternale versus paternale Transmission von Allel 4 bei allen Indexpersonen.

Der Unterschied ist damit nicht signifikant für einen maternalen Transmissionseffekt, kann jedoch als ein Hinweis auf einen Effekt gelten.

Vergleicht man das Ergebnis unseres  $\chi^2$ -Heterogenitäts-Tests mit dem von Bennett und Mitarbeiter (1997), die einen maternalen Transmissionseffekt für das Allel 814 mit  $p_{het.} = 0,0017$  ( $\chi^2_{het.} = 9,856$ ) finden, muss berücksichtigt werden, dass in deren Arbeit mehr als fünf mal so viele Transmissionsereignisse untersucht werden konnten. Ließe sich die Effektstärke in unseren 55 Trios auf eine entsprechend größere Gruppe übertragen, läge deren  $p_{het.}$ -Wert in einem signifikanteren Bereich als in der Arbeit von Bennett. Der extrapolierte  $p_{het.}$ -Wert bei gleicher Effektstärke würde in einer 5x größeren Gruppe 0,0015 betragen. Zunächst bleibt jedoch zu beweisen, dass sich die in unserer kleinen Gruppe gegebenen Zahlenverhältnisse auch auf eine Großgruppe übertragen lassen.

Stratifizierung:

Analog zu Tabelle 3.9. (b, c) werden in Tabelle 3.10. (b, c) die maternalen und paternalen Transmissionen bei Söhnen und Töchtern getrennt verglichen. Unter der Berücksichtigung, dass die  $P$ -Werte nicht für Tests mit kleinen Fallzahlen (und für multiples Testen) korrigiert sind, mag man hier folgende Gegebenheiten erkennen: Bei den Töchtern (Tab. 3.10-c.) lässt sich ein maternaler Transmissionseffekt mit großer Sicherheit ausschließen ( $\chi^2_{het.} = 1,96 \times 10^{-3}$ ;  $df = 1$ ;  $p_{het.} = 0,97$ ). Ein kleiner Hinweis auf den Effekt ergibt sich aber bei den Söhnen, wo sich die  $p$ -Werte um mehr als eine Potenz voneinander unterscheiden und der  $p_{het.}$ -Wert bei 0,12 liegt ( $\chi^2_{het.} = 2,38$ ;  $df = 1$ ).

Tab. 3.10-b:

Söhne:	Maternal	Paternal
<b>Allel 4</b>	9	8
<b>Nicht Allel 4</b>	1	5
<b>% t Allel 4</b>	90,0	61,5
<b><i>P</i></b>	0,011	0,41
<b><math>\chi^2</math> het. <i>p</i>-Wert</b>	0,12	

Tab. 3.10-c:

Töchter:	Maternal	Paternal
<b>Allel 4</b>	16	15
<b>Nicht Allel 4</b>	1	1
<b>% t Allel 4</b>	94,1	93,8
<b><i>P</i></b>	$0,27 \times 10^{-3}$	$0,47 \times 10^{-3}$
<b><math>\chi^2</math> het. <i>p</i>-Wert</b>	0,97	

Tab. 3.10. (a – c): Maternale versus paternale Transmissionen von Allel 4 auf Kinder mit Psoriasis vulgaris: (a) Alle Indexpersonen, (b) Söhne getrennt, (c) Töchter getrennt. Bei den Söhnen ergibt sich mit  $p_{het.} = 0,12$  ein gewisser Hinweis auf einen maternalen Transmissionseffekt, während sich bei den Töchtern kein Unterschied von maternalen zu paternalen Transmissionen zeigt. Für alle Indexpersonen liegt der  $p_{het.}$ -Wert bei 0,16 (Tab. 3.10-a).



### 3.8. Söhne versus Töchter bei der Allel-Verteilung

Die unterschiedliche Anzahl der männlichen und weiblichen Indexpersonen bei den maternalen Trios (Tabelle 3.8.) lässt an die Beteiligung eines geschlechtschromosomalen Gens denken. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob bei den Alleltransmissionen der beiden Marker eine Abhängigkeit vom Geschlecht der Indexperson besteht.

Bei Corneodesmosin (Tab. 3.11.) erkennt man, dass Allel 2 bei 57 Söhnen nur zu 59,7 % transmittiert wird, während es bei den 73 Töchtern zu 74,0 % von einem heterozygoten Elternteil transmittiert wird. Die *P*-Werte weisen einen Unterschied von mehr als drei 10er Potenzen auf; der  $\chi^2$ -Unabhängigkeits-Test ergibt einen  $p_{het.}$ -Wert von 0,083.

Den gleichen Unterschied findet man bei den Allel-4-Transmissionen von TN62. Bei 23 rekrutierten Söhnen beträgt der Anteil der Transmissionen des Risiko-Allels 73,9 %. Dieser Wert liegt gegenüber der Transmissionsrate der insgesamt 33 Töchter 20,0 Prozentpunkte niedriger (93,9 %; Tab. 3.12.). In diesem Fall ergibt der  $\chi^2$ -Unabhängigkeits-Test einen signifikanten  $p_{het.}$ -Wert von 0,035.

Tab. 3.11.: Transmission von Allel 2 von allen Elternteilen Söhne versus Töchter.

CDSN*1243	Allel 1	Allel 2	% t Allel 2	<i>P</i>	$\chi^2$ het. <i>P</i> -Wert
<b>Söhne</b>	23	34	59,7	0,15	0,083
<b>Töchter</b>	19	54	74,0	0,000042	

Tab. 3.12.: Transmission von Allel 4 von allen Elternteilen Söhne versus Töchter

TN62	Allel 4	Nicht Allel 4	% t Allel 4	<i>P</i>	$\chi^2$ het. <i>P</i> -Wert
<b>Söhne</b>	17	6	73,9	0,018	0,035
<b>Töchter</b>	31	2	93,9	0,45x 10 <sup>-6</sup>	

Diese Ergebnisse zeigen, dass es nicht nur bei der Vererbung der Krankheit selbst (Tab. 3.8.) von Bedeutung ist, welchem Geschlecht die Indexperson angehört, sondern dass auch die Alleltransmissionen der beiden Marker vom Geschlecht der Indexperson abhängig zu sein scheinen.

Dieser verblüffende Befund muss jedoch an einer größeren Gruppe auf seine Validität überprüft werden.

## 4. Diskussion

### 4.1. Diskussion der Ergebnisse des Transmission/Disequilibrium-Test

Die Psoriasis vulgaris ist eine chronische entzündliche Hauterkrankung mit einer komplexen genetischen Basis. Forschungsgruppen rund um die Welt (USA, Kanada, Japan, Deutschland, England, Finnland, Schweden, Italien, u.a.) sind seit einigen Jahren dabei, distinkte Suszeptibilitäts-Gene für die Krankheit ausfindig zu machen. Diese Arbeit ist insbesondere durch die Polygenie und Heterogenität der Psoriasis vulgaris erschwert.

Bislang wurden nur Suszeptibilitäts-Loci kartiert, die Identifizierung der jeweiligen Suszeptibilitäts-Gene steht jedoch noch aus. Somit ist auch die Funktion und Rolle, die Suszeptibilitäts-Gene in der Biologie der Psoriasis spielen, weiterhin unklar. Über parametrische und nicht-parametrische Kopplungsanalysen wurden zahlreiche putative Regionen für Psoriasis-Suszeptibilitäts-Loci auf Chromosom 1cen-q, 2p, 3q, 4q, 6p, 8q, 16q, 17q, 19p und 20p gefunden (Capon et al., 1999; Enlund et al., Jan. u. April 1999; Matthews et al., 1996; Nair et al., 1997; Tomfohrde et al., 1994; Lee et al., 2000; u. a.). Die signifikantesten Ergebnisse und am häufigsten reproduzierten Hinweise auf Kopplung erhielt man jedoch vornehmlich für die chromosomale Region auf Chromosom 6p bzw. die HLA-Region (Trembath et al., 1997; Nair et al., 1997; Jenisch et al., Mai 1998; Jenisch et al., Nov. 1998; Burden et al., 1998; Samuelsson et al., 1999; Balendran et al., 1999; Lee et al., 2000; u. a.). Das Risiko für HLA-Cw6-Genträger, an Psoriasis zu erkranken, ist gegenüber den Nicht-Gen-Trägern um das 10 – 12 Fache erhöht (Elder et al., 1994; Christophers und Henseler, 1989). Die stark, aber nicht so stark wie beispielsweise beim M. Bechterew (relatives Risiko bei HLA-B27 ~ 90), imponierende HLA-Assoziation der Psoriasis vulgaris ist seit langem bekannt (Russel et al., 1972; Brenner et al., 1978; Tiilikainen et al., 1980).

So ist man sich zur Zeit darüber einig, dass mindestens ein wichtiges Suszeptibilitätsgen im Major-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) liegen muss, das die Assoziation der Krankheit mit bestimmten Allelen der HLA-Komponenten-A, -B, -C, -DR, -DQ und -C4 erklärt. Tatsächlich gehören die meisten dieser Allele zu zwei *ancestralen Haplotypen* (Ikäheimo et al., 1996; Schmitt-Egenolf et al., 1996; Jenisch et al., Nov. 1998), die mit *EH-57.1* und *EH-13.1* benannt sind (Degli-Eposti et al., 1992). Die zu überprüfenden möglichen Suszeptibilitätsgene im MHC befinden sich in einem Bereich von 4 MB. Derzeitige Studien favorisieren dabei einen Abschnitt nahe HLA-B und -C (Balendran et al., 1999; Oka et al.,

1999; Teraoka et al., 2000; Nair et al., 2000). Dieser Bereich enthält eine Reihe von nicht-HLA-Genen (Tab. 1.5.), die ebenfalls eine Vielzahl von Polymorphismen beherbergen (Teraoka et al., 2000; Tay et al., 2000; Asumalathi et al., 2000; Enerbäck et al., 2000). Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich ein Suszeptibilitätsgen in unmittelbarer Nähe zu HLA-B und -C befindet, dass es sich hier aber weder um HLA-B noch um HLA-C selbst handelt (Trebath et al., 1997; Jenisch et al., Nov. 1998; Nair et al., 2000).

Aufgrund biochemischer Untersuchungen stellt Corneodesmosin in vielerlei Hinsicht ein interessantes Kandidaten-Gen für die Psoriasis vulgaris dar. Es wird von den Keratinozyten synthetisiert, wird aus der Zelle ausgeschleust und ist erst in und dann außerhalb der Desmosomen nachweisbar. Den hohen Anteil der Aminosäuren Glycin und Serin findet man so nur bei epidermalen Strukturproteinen. Mit dem proteolytischen Mechanismus der Maturation vom 52-56 kDa-Protein zum 33 kDa-Rest, bei dem sich die Bindungseigenschaften des Proteins verändern, spielt Corneodesmosin wahrscheinlich eine bedeutende Rolle in der Ausbildung der Corneodesmosomen und deren Funktion beim Desquamationsprozess (Serre et al., 1991; Lundstrom et al., 1994; Guerrin et al., 1998). Die ultrastrukturelle Untersuchung von psoriatischer Epidermis lässt erkennen, dass die Transformation der Desmosomen zu den Corneodesmosomen vom Stratum granulosum zum Stratum corneum nicht stattfindet (Guerrin, 1998). Vicanová und Mitarbeiter (1996) zeigen, dass die sogenannte rekonstruierte Epidermis von Normalpersonen, die aus einer Kultur von Keratinozyten unter den Bedingungen eines „Luft-feuchten Übergangs/air liquid interface“ gewonnen wird, eine gestörte Desquamation aufweist. Insbesondere kommt es hier zu einer verzögerten Transformation der Desmosomen in Corneosomes. Durch Vergleichsuntersuchungen der rekonstruierten Epidermis und der in vivo gewonnenen Psoriasis-Epidermis kamen Vicanová und Mitarbeiter (1996) zu dem Schluss, dass auch bei der Psoriasis eine Transformationsstörung der Desmosomen vorliegen könnte. In diesem Zusammenhang sei noch einmal auf Kapitel 1.8.4. verwiesen. Dort wird verdeutlicht, wie Corneodesmosin sich zunächst in zytoplasmatischen Einschlusskörperchen befindet, dann gespalten wird und schließlich als Bestandteil von Corneodesmosomen in den „cornified cell envelope“ eingebunden ist.

Wie in mehreren Studien gezeigt wurde, sind die Polymorphismen im Corneodesmosin-Gen stark mit Psoriasis vulgaris assoziiert (Jenisch et al., 1999; Allen et al., 1999). Auch die in der HLA-Region durchgeführten genetischen Analysen schließen es nicht aus (Balendran et al., 1999) bzw. unterstützen die Möglichkeit (Oka et al., 1999), dass bestimmte Corneodesmosin-Polymorphismen mit einer Prädisposition zur Psoriasis vulgaris einhergehen.

In Bezug auf den oben dargestellten Forschungsstand analysierten wir in unserer Arbeit bei 199 deutschen *Falk-Rubinstein-Trios* (Falk und Rubinstein, 1987) mit einer eindeutig an Psoriasis vulgaris erkrankten Indexperson die Marker TN62 und CDSN\*1243 und untersuchten die Transmission der Allele in den Familien mit Hilfe des Transmissions/Disequilibrium-Tests (TDT). Dieses Verfahren beurteilt mit Hilfe der  $\chi^2$ -Statistik die Abweichung von der 50%-Verteilung bei den von allen heterozygoten Eltern ausgehenden Allel-Transmissionen (Spielman et al., 1993). Signifikante *P*-Werte des TDTs deuten auf das Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichts zwischen Markerloкус und dem putativen Suszeptibilitätsloкус hin oder lassen sogar auf eine direkte Involvierung der genetischen Variante in die Pathogenese der Krankheit schließen.

Die Ergebnisse des TDTs sind in Tabelle 3.6. (a) – (c) zusammengefasst (Kap. 3.6.). Zu berücksichtigen sind die  $p_{\text{exakt}}$ -Werte. Bei 137 informativen Familien zeigt sich für CDSN\*1243 ein signifikantes Überwiegen der Transmission von Allel 2 ( $p_{\text{exakt}} = 0,0084$ ). Allel 2 ist in unserer Untersuchung durch die Base Cytosin an Position +1243 definiert, wobei der entsprechende Triplet-Code des CDSN-Gens (Position 394) die Aminosäure Serin codiert (Tab. 3.5.). Bereits an der Häufigkeit und Verteilung der CDSN-Allele (Abb. 3.3.) erkennt man das im Verhältnis überwiegende Vorkommen von CDSN(C) (~ Allel 2) bei den Betroffenen mit familiärer Psoriasis (62,5 % im Vergleich zu 49,8 % bei der Nicht-Betroffenen-Gruppe, Abb. 3.3.). In auffälliger Weise zeigt die Extraktion der wenigen sporadischen Psoriasis-Fälle (Gruppe 3) aus der Gesamtgruppe der Betroffenen, dass bei diesen geradezu ein umgekehrtes Verhältnis zu Gunsten von CDSN(T) (~ Allel 1) vorherrscht. Führt man mit den 19 sporadischen Trios einen separaten TDT durch, ergibt sich ein zu ca. 95 % ausgeglichenes Transmissionsverhältnis der beiden Allele (Daten nicht aufgeführt). Würde man die Transmissions-Ereignisse der sporadischen Trios aus der Gesamtberechnung des TDTs entfernen, müsste man somit einen noch signifikanteren  $p_{\text{exakt}}$ -Wert als 0,0084 für CDSN(C) erwarten ( $p \sim 0,0065$ , Daten nicht aufgeführt). Trotz der recht geringen Zahl der sporadischen Trios ( $n = 19$ ) mag deren Verschiedenartigkeit von der Gesamtgruppe der Betroffenen nicht allein mit einer zufälligen Abweichung begründet sein. Unter Umständen gehören diese Betroffenen einer genetisch unterschiedlichen Gruppe an, in der die Psoriatiker nicht Träger des Psoriasis-typischen *ancestralen Haplotyps* bzw. des Cw6- oder DR7-Allels sind.

Für TN62 ergibt sich im Vergleich zu CDSN\*1243 ein wesentlich signifikanterer *p*-Wert. Bei insgesamt 21 verschiedenen Marker-Allelen in der Untersuchungsgruppe und 57

informativen Familien für Allel 4 ergibt das Allel 4 mit einem  $p_{\text{exakt}}$ -Wert von  $6,2 \times 10^{-7}$  hier den signifikantesten TDT-Wert.

Zunächst lässt sich feststellen, dass diese Ergebnisse gut mit anderen Assoziationsstudien *übereinstimmen* (s. Kap. 1.8.):

Der TDT ergibt für den Marker CDSN\*1243 mit einem  $p_{\text{exakt}}$ -Wert von 0,0084 keinen Wert, der so signifikant ist, dass man vermuten könnte, die Basensubstitution und der daraus resultierende Aminosäuren-Austausch (Leucin → Serin) sei ein ursächlicher Defekt für die Psoriasis vulgaris. Dies ist auch deswegen unwahrscheinlich, weil die Frequenz des Allels in der Normalbevölkerung sehr hoch ist (~ 50 %, Tab. 3.3., Übereinstimmung mit Tazi-Ahnini, 1999).

Der Mikrosatelliten-Marker TN62 aber ist sehr deutlich mit der Psoriasis vulgaris assoziiert, so wie es auch Balendran und Mitarbeiter (1999) herausgefunden haben (Balendran:  $p = 1,0 \times 10^{-7}$ ; unsere Studie:  $p = 6,2 \times 10^{-7}$ ). Daraus folgt, dass sich TN62 höchstwahrscheinlich in einem starken Kopplungsungleichgewicht mit dem putativen PSORS1-Gen befindet. Da sich Kopplungsungleichgewichte bei Assoziationsstudien über weite Distanzen der DNA-Abschnitte (~ 500 kb) auswirken können (Gonçalo et al., 2000), bedeuten die hoch-signifikanten Ergebnisse für TN62 nicht, dass sich der Marker auch physikalisch nahe am gesuchten Gen befindet. Schmitt-Egenolf und Mitarbeiter (1996) rekrutierten für die bedeutungsvolle Studie zum *EH-57.1* ihre Probanden zum großen Teil in denselben Gebieten Deutschlands und mit denselben Kriterien wie wir. Es lässt sich vermuten, dass TN62\*4 ebenfalls zum *ancestralen Haplotyp* gehört (→ Cw6-B57-TN62\*4-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0303).

Die Besonderheit dieser Studie besteht darin, dass wir TN62 (285 kb proximal gelegen von HLA-C) und CDSN\*1243 (160 kb distal gelegen von HLA-C) zusammen in einer großen Studiengruppe untersucht haben. Die beiden Marker liegen ca. 448 kb voneinander entfernt. Aufgrund der unterschiedlichen Heterozygotie bzw. PIC-Werte der Marker (Tab. 3.7.) lässt sich allerdings nicht beurteilen, welche Seite des HLA-C-Lokus stärker mit der Krankheit assoziiert bzw. mit dem putativen PSORS1-Gen gekoppelt ist. Zwei Marker reichen nicht aus, um diese Frage mit genügender Sicherheit zu beantworten. Zwar unterscheiden sich die gemessenen  $p$ -Werte um mehr als vier 10er Potenzen, für den „biallelischen Marker“ CDSN\*1243 sind gegenüber dem Mikrosatelliten-Marker TN62 aber auch „schlechtere“  $p$ -Werte zu erwarten.

Das putative PSORS1-Gen mag distal von HLA-C liegen wie beispielsweise auch Jenisch und Mitarbeiter (1999), Oka und Mitarbeiter (1999) und Nair und Mitarbeiter (2000) annehmen, oder es mag sich proximal von HLA-C oder HLA-B befinden (Balendran et al., 1999; Tay et al., 2000 ; u. a.). Vorstellbar ist, dass es in der HLA-Region zwei unabhängige Psoriasis-Suszeptibilitäts-Loci gibt, wie eine rezente Untersuchung von Schmitt-Egenolf und Mitarbeitern (2001) nahe legt. Auffällig ist, dass bei TN62 auch die sporadischen Trios zur Assoziation beitragen, hingegen bei CDSN\*1243 ausschließlich die familiären Trios. Diese Beobachtung legt nahe, dass Corneodesmosin wahrscheinlich nicht zum *EH57.1* gehört sondern zu einem anderen Haplotyp oder aber, dass es unmittelbar in das Krankheitsgeschehen involviert ist.

Im Detail fallen beim Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Studien auch *einige Unterschiede* auf:

Allen und Mitarbeiter (1999) erhalten bei ihrem TDT für CDSN\*1243(C) einen *p-Wert* von 0,0003, der um über eine 10er-Potenz signifikanter als unserer Wert ist. Ihr designierter Allel-5-Haplotyp {+619(T), +1240(G) und +1243(C)} ergibt ein *P* von 0,0000028. Diese wesentlich stärkeren Assoziationswerte mögen darauf zurückzuführen sein, dass Allen und Mitarbeiter 152 Eltern-Kind-Trios verwendet haben, von denen aber nur 99 aus unabhängigen Familien stammen. Der TDT gibt für die Assoziation der Marker-Allele in diesem Fall keine validen Werte an (Spielman et al., 1996). Wir dagegen haben 199 unabhängige Trios („simplex only“) verwendet und erfüllen die Bedingungen für den „Test auf Kopplungsungleichgewichte“ vollständig. Somit ist anzunehmen, dass die tatsächliche Assoziation der CDSN-Polymorphismen mit der Psoriasis vulgaris eher im mittleren signifikanten Bereich wie in unserer Studie ( $p_{\text{exakt}} = 0,0083$ ) liegt.

Im Nachhinein ergibt die Tatsache, dass wir die anderen SNPs (+619 und +1240) nicht mitgetestet haben, einen nachteiligen Mangel an Information für die Untersuchung. Für die Aufstellung von Haplotypen und den Nachweis der Vererbung der Marker-Allele „in Cis“ ist dabei eine erweiterte Technik bei der Marker-Bestimmung notwendig. Von Interesse wäre, ob sich in unserer Gruppe ein Basen-Polymorphismus an Position +1240 befindet. Jenisch und Mitarbeitern (1999) konnten diesen in Deutschland nicht nachweisen. Zumindest stützt die gefundene Assoziation für CDSN\*1243(C) auch die Ergebnisse von Jenisch und Mitarbeitern (1999), denn deren als CD-2-Allel bezeichneter Haplotyp besitzt ebenfalls die Aminosäure Serin an Position 395 (~ Cytosin an +1243 ~ Allel 2).

Unser erneut erbrachter Hinweis darauf, dass CDSN\*1243(C) mit Psoriasis vulgaris assoziiert ist, widerspricht deutlich den Ergebnissen von Ishihara und Mitarbeitern (1996) und Tazi-Ahnini und Mitarbeitern (1999) (s. Kap. 1.8.5.). Das Ergebnis von Ishihara und Mitarbeitern (1996), die keinen signifikanten Unterschied der Polymorphismen zwischen Betroffenen und Kontrollen finden, lässt sich vielleicht damit erklären, dass sie nur Psoriater ohne Familienanamnese und somit vermutlich nur den Typ 2 der Psoriasis vulgaris untersucht haben. Das Erkrankungsalter ihrer Probanden ist nicht angegeben. Jedoch fanden sie auch bei den Cw6 oder Cw7 positiven Probanden und den entsprechend „gematchten“ Kontrollen keinen signifikanten Unterschied. Dies mag nun wiederum an der geringen Anzahl der Probanden liegen (n = 27). Allerdings bemerkten sie andeutungsweise eine Assoziation von HLA-Cw6 mit den Allelen +619(T), +1240(G) und +1243(C). Deshalb könnte man vermuten, dass die Assoziation der S-Gen-Polymorphismen dort nicht signifikant ist, weil in Japan HLA-Cw6 bei Psoriatikern nur mit einer Häufigkeit von ca. 10 % vorkommt. In der europäischen Bevölkerung wäre die deutlich vorhandene Assoziation der SNPs mit der Psoriasis aufgrund eines Kopplungsungleichgewichts mit HLA-Cw6 oder -DR7 verständlich, da diese HLA-Komponenten hier mit einer Häufigkeit von 85 % beim Typ 1 der Psoriasis zu finden sind (Henseler und Christophers, 1985). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die, dass in Japan ein anderes PSORS1-Gen existiert als in Europa (Heterogenität der Psoriasis). Mit anderen Worten: Es lässt sich nicht ausschließen, dass Corneodesmosin bei der kaukasischen Bevölkerung ein Suszeptibilitätsgen darstellt in Japan aber nicht.

Das Ergebnis von Tazi-Ahnini und Mitarbeitern (1999) jedoch ist „merkwürdig“. In der „Trend“-Analyse fanden sie eine Assoziation der Psoriasis vulgaris mit einer Homozygotie des in der Kontrollgruppe selteneren Allel 2, welches nach deren Beschreibung jedoch CDSN(T) darstellte. Diese Beobachtung widerspräche uns und allen anderen Studien in Europa, die eine Assoziation von CDSN(C) beschreiben. Scheinbar handelt es sich um eine missverständliche und fehlerhafte Darstellung der Marker-Typisierung im Artikel. Teraoka und Mitarbeiter (1999) bemerken dieses widersprüchliche Ergebnis; Enerbäck und Mitarbeiter (2000) und andere Autoren stellen die Dinge so dar, als wenn Tazi-Ahnini und Mitarbeiter (1999) CDSN(C) gemeint hätten. Dies so anzunehmen, ist für die Interpretation aller Beobachtungen sicherlich einfacher. Im Prinzip aber müsste abgeklärt werden, welches Allel bei Tazi-Ahnini und Mitarbeitern (1999) wirklich gemeint ist, bevor man deren Ergebnisse diskutieren kann.

Der Anzahl der verwendeten *unabhängigen* Trios nach handelt es sich bei unserer Studiengruppe um die größte Psoriasis-Probanden-Gruppe, die bisher sowohl auf den Marker

TN62 als auch gleichzeitig auf einen CDSN-Polymorphismus hin untersucht wurde ( $n = 199$  unabhängige Trios). Außerdem zeichnet sich die Studiengruppe durch ein auffällig niedriges „age of onset“ der Indexpersonen (ca. 12 Jahre) und durch einen hohen Trio-Anteil aus, bei dem ebenfalls ein Elternteil oder ein weiterer anderer naher Angehöriger von Psoriasis betroffen ist (Tab. 3.3.). Somit bezieht sich unsere Analyse sehr spezifisch auf den Psoriasis-Typ 1, bei dem Betroffene häufig die für die Psoriasis typische HLA-Assoziation (Cw6, B13, Bw57 oder DR7), eine positive Familienanamnese und ein niedriges Erkrankungsalter aufweisen (Henseler und Christophers, 1989). Zu bemerken ist auch, dass die Trios aus einem vergleichsweise weiten Umkreis rekrutiert wurden, eine weitere ethnische Durchmischung der Studiengruppe aber begrenzt wurde, um deren Homogenität zu bewahren (Abb. 3.2.). Die Ergebnisse unserer Untersuchung können daher - meiner Meinung nach - als sehr verlässliche Aussagen für die Typ1-Psoriasis gelten.

Entgegen der idealen Eigenschaft als Kandidaten-Gen der Psoriasis sprechen die Ergebnisse mehrerer neuerer Studien dagegen, dass es sich beim Corneodesmosin-Gen um ein unmittelbar involviertes Suszeptibilitäts-gen handelt.

Trotz der genauen Analyse von 15 SNPs in den beiden Exonen des Gens und der Aufstellung von Haplotypen fanden Enlund und Mitarbeiter (2000) keinen Hinweis darauf, dass bestimmte Polymorphismen funktionell irgendeinen Einfluss auf die Entstehung der Psoriasis haben. Für CDSN\*1243(C) fanden sie bei 104 untersuchten Familien im TDT ein  $p$  von 0,0035. Für den SNP an Position +722 ergab sich ein  $p$  von 0,000057. An dieser Stelle kommt es jedoch zu keinem Aminosäuren-Austausch. Untersuchte man nur HLA-Cw6-negative Familienmitglieder, zeigte sich kein Unterschied der Allel-Transmissionen von CDSN\*722(T). An dieser Arbeit nachprüfenswert ist der dezente Hinweis auf eine Involvierung von CDSN\*619(T/T).

Mehr Gewicht dagegen haben die Untersuchungen von Nair und Mitarbeitern (2000). Mit großer Sicherheit schlossen sie HLA-C und Corneodesmosin als Kandidaten-Gene für die Psoriasis vulgaris aus. Mit Hilfe der „rekombinanten ancestralen Haplotyp-Analyse“ und der „moving-window“-Strategie unter Verwendung von 339 (!) unabhängigen Trios identifizierten sie zunächst 2 Risiko-Haplotypen (*RH.1* und *RH.2*). *RH.1* erstreckt sich telomer von HLA-C über ein 59,4-kb-Fragment des *EH-57.1* (von M6S167 bis M6S111). *RH.2* ist noch weiter telomer zwischen den Markern M6S200 und M6S162 als ein 126,6-kb-Fragment zu finden. Während *RH.1* im TDT allein betrachtet ein signifikantes Transmissionsungleichgewicht besaß ( $p = 0,0065$ ), war dies bei *RH.2* nicht der Fall (T:NT ~ 6:9). Die Signifikanz des Unterschieds bei den zwei Risiko-Haplotypen lag bei  $P = 0,03$ . Daraus



folgern Nair und Mitarbeiter (2000), dass nur der Abschnitt *RH.1* als Träger von PSORS1 in Frage kommt. Das Corneodesmosin-Gen und die Gene *PG8*, *POU5F1* und *TCF19* (Tab. 1.5.) liegen auf *RH.2*. Sie alle werden von Nair und Mitarbeitern (2000) somit als Kandidatengene ausgeschlossen.

Das *PG8(HCR)*-Gen stellt ein sehr interessantes Kandidatengen für die Psoriasis dar (Asumalathi et al., 2000), das auf jeden Fall weiter untersucht werden sollte. *TCF19* dagegen wurde bereits auf anderem Wege als Suszeptibilitäts-gen für die Psoriasis vulgaris ausgeschlossen (Teraoka et al., 2000). Zur weiteren Analyse eignen sich nach der Arbeit von Nair und Mitarbeitern (2000) somit insbesondere die Gene *NOB4*, *HCGII-2* und *HCGIX-3* auf dem *RH1*, wobei es sich hier allerdings um Pseudogene handelt.

Auch außerhalb von *RH.1* und *RH.2* gibt es aktuelle Hinweise auf ein neues Kandidatengen im MHC, nämlich *PERB11* (Tay et al., 2000). Es bleibt abzuwarten, ob die Untersuchungen von Nair und Mitarbeitern (2000) den zukünftigen Analysen standhalten und ob eines ihrer vorhergesagten Kandidaten-Gene bestätigt werden kann.

Meiner Meinung nach sollte Corneodesmosin als Kandidaten-Gen für die Psoriasis vulgaris noch nicht vollends außer Acht gelassen werden. Vielleicht handelt es sich bei der genetischen Veränderung am Corneodesmosin-Gen, falls diese eine Psoriasis vulgaris verursacht, weniger um die Bildung einer Proteinstruktur-anomalie als vielmehr um eine Regulationsstörung des Gens. Zumindest gilt, dass kein Gen als Suszeptibilitäts-gen ausgeschlossen werden kann, solange man nicht dessen zugehörige Promotor-Region untersucht hat.

In einer bisher nicht veröffentlichten Arbeit (Schmitt-Egenolf et al., 2001) konnte mit Hilfe des erweiterten TDTs nach Wilson (Wilson, 1997) gezeigt werden, dass im Vergleich vom *EH57.1* und vom Corneodesmosin-Haplotyp {+619(T), +1236(T) und +1243(C)} dieser *TTC*-Haplotyp eine deutlich höhere Assoziation mit Psoriasis vulgaris aufweist.

*Wahrscheinlich ergibt sich die Assoziation der SNPs im S-Gen allein aufgrund eines Kopplungsungleichgewichts.*

Die Existenz der *ancestralen Haplotypen* spiegelt die demographische Entwicklung des Menschen wider, der vermutlich vor etwa 44.000 Jahren einen bestimmten Teil Afrikas verlassen hat (Underhill et al., 2000; Quintana-Murci et al., 1999). Es ist denkbar, dass der *EH57.1* einen Haplotyp darstellt, der bereits zu jener Zeit bestanden hat und auf dem es dann später zu einer Mutation oder auch mehreren Mutationen im PSORS1-Lokus gekommen ist. Das Durchlaufen verschiedener „bottlenecks“ mit einer anschließenden Expansion der

Bevölkerung führte dann zu einer Vermehrung dieses Risiko-Haplotypen. Gruppen, die in unterschiedliche Regionen ausgewandert sind und sich dort vermehrt haben (Mittlerer Osten/Europa, Japan), waren dabei unterschiedlichen Einflüssen ausgesetzt und haben verständlicher Weise eine unterschiedliche „Mutationsgeschichte“ in Bezug auf das Psoriasis-Suszeptibilitäts-gen. Viele Ereignisse, die bei der Besiedlung Europas eine wichtige Rolle gespielt haben, sind heute noch als „bottleneck“-Effekt in der Bevölkerung nachweisbar. Einen großen Einfluss mag beispielsweise die europäische Eiszeit (bis vor ca. 11.000 Jahren), die vermutliche Überflutung einer großen Zahl erster neolithischer Siedlungen am Bosphorus (vor ca. 7.500 Jahren) oder auch der Dreißigjährige Krieg (1618 bis 1648) gehabt haben. Bei der zuletzt genannten „Katastrophe“ kam es in Deutschland zu Bevölkerungsverlusten von bis zu 50 %.

Mit diesem Modell im Hintergrund lässt sich gut erklären, warum heutzutage in Japan gegenüber Europa und Nordamerika bei der Psoriasis vulgaris sehr unterschiedliche HLA-Assoziationen imponieren (s. Abb. 4.1.a. & b.). In diesem Zusammenhang stellt sich die sehr interessante Frage nach dem Alter des Mikrosatelliten-Marker TN62 und dem Allel 4 des Markers. Grundsätzlich könnte man überprüfen, ob dieser anonyme Marker vielleicht bereits zusammen mit dem „Ur-Haplotypen“ aus Afrika „ausgewandert“ ist. Dazu müsste man dessen Assoziation bei den japanischen Psoriatikern überprüfen oder bei chinesischen Betroffenen. Ergäbe sich in diesen Bevölkerungen, die mit der europäischen Bevölkerung im Vergleich zu anderen Bevölkerungen besonders weit entfernt verwandt sind (s. Abb. 4.1.a.), ebenfalls eine starke Assoziation von TN62, könnte man vermuten, dass sich das PSORS1-Gen auf einem sehr weiten Abschnitt bis centromer von HLA-B befindet.

Über die CDSN\*1243-Assoziation kann man sagen, dass es sich hier wohl um einen alten gut konservierten Strukturprotein-Polymorphismus handelt, der aber womöglich erst nach der Auswanderung des *EH57.1*-Haplotyps aus Afrika durch ein „bottleneck“ jüngeren Datums in Europa entstanden ist.

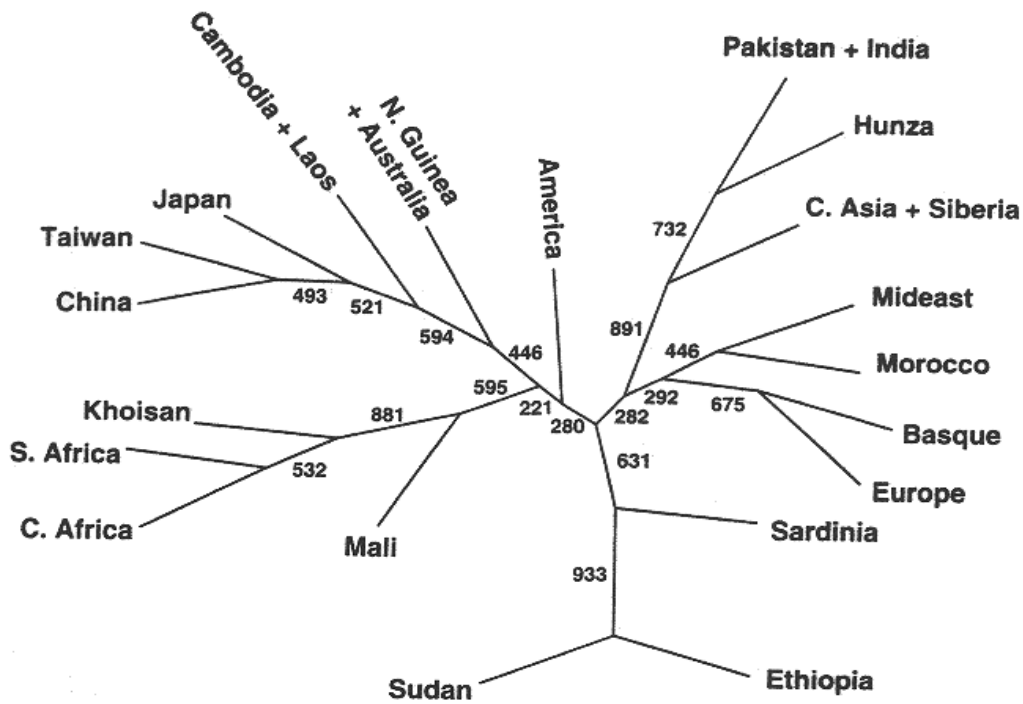


Abb. 4.1.a.: Verwandtschafts-Beziehungen der Völker, die sich aus der Analyse der nicht-rekombinierenden Region auf dem Y-Chromosom ergibt (Abb. Underhill und Mitarbeiter, 2000). Es zeigt sich, dass Japaner und Chinesen von Europäern und Basken sehr weit entfernt sind.

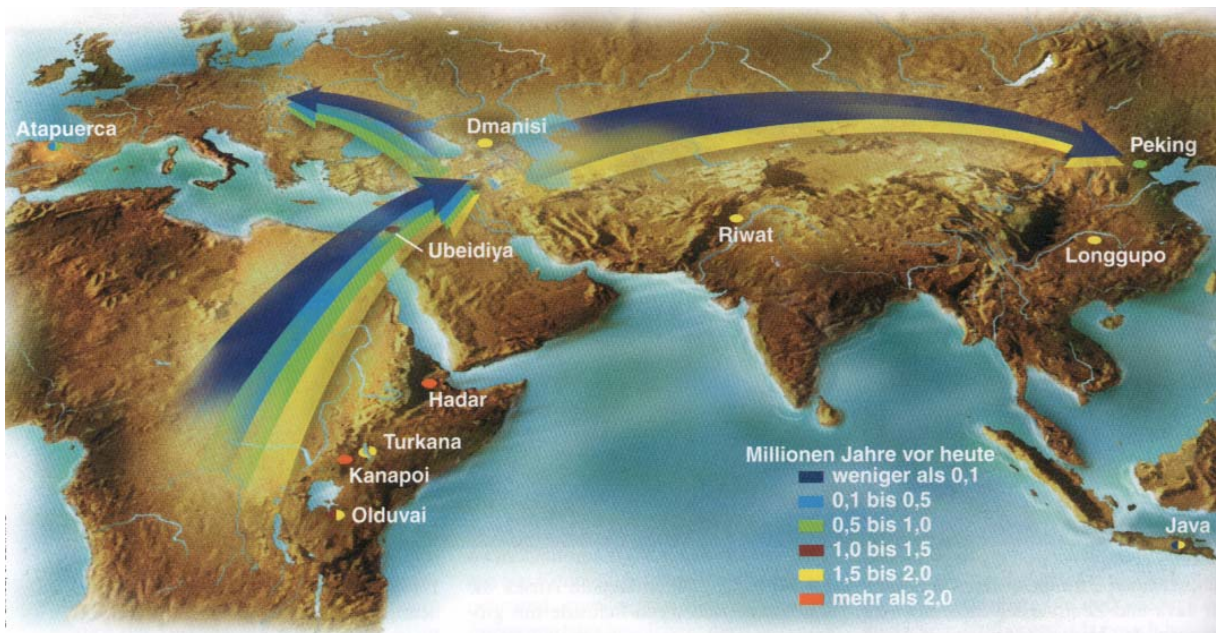


Abb. 4.1.b.: Auch die Fossilbefunde belegen den gemeinsamen afrikanischen Ursprung der Völker und die Wanderung des frühen Menschen aus Afrika nach Eurasien. Diese fand offenbar in mehreren Wellen statt und führte so zu komplizierten speziellen regionalen Entwicklungen (Spektrum der Wissenschaft, Dossier 3/2000).

#### 4.2. Maternale versus paternale Vererbung auf der Ebene des Phänotyps

Die komplexe Genetik der Psoriasis drückt sich insbesondere darin aus, dass es bisher nicht möglich ist, ihr ein bestimmtes Vererbungsmodell definitiv zuzuordnen. Aufgrund der molekularen Daten, d. h. der oben erwähnten Kopplungsanalysen, ist man sich weitgehend darüber einig, dass es sich um eine polygene und gleichzeitig heterogene Hautkrankheit handelt. Ein einfaches rezessives oder dominantes Vererbungsmodell kann bei der Psoriasis somit nicht erwartet werden.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung eines paternalen Effekts, denn es sprechen einige Untersuchungen dafür, dass bei der Psoriasis vulgaris das Erkrankungsrisiko der Kinder größer ist, wenn der Vater betroffen ist als wenn die Mutter betroffen ist. Wie in Tabelle 1.2. aufgelistet und in Kapitel 1.8.1. dargestellt, wird der ursprünglich von Traupe und Mitarbeitern (1992) herausgearbeitete Effekt inzwischen durch mehrere Studien weiter bestätigt. Wenn es bei einigen dieser Studien an der statistischen Signifikanz mangelt, so ist insgesamt aber doch ein Trend vorhanden, der jedes Mal in dieselbe Richtung weist. Wie man am Beispiel von Swanbeck und Mitarbeitern (1994) erkennt, scheinen die auf dem Gebiet der Psoriasis-Genetik forschenden Gruppen die Frage nach einem paternalen oder auch maternalen Effekt gelegentlich zu ignorieren. So wie Farber und Nall (1974) erwähnen auch Swanbeck und Mitarbeiter (1994) den deutlich in ihren Daten erkennbaren Effekt nicht.

Im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchungen auf Chromosom 6 und 19 haben wir hier eine Studiengruppe von 199 Eltern-Kind-Trios vorliegen, bei denen in ~ 57 % der Fälle (114 Trios) jeweils ein Elternteil mitbetroffen ist (Tab. 3.3.). Weder das Geschlecht der Indexperson noch die Transmission vom Vater oder von der Mutter war ein Selektionskriterium bei der Auswahl der Familien.

In Abbildung 3.4.(a) erkennt man jedoch, dass bei den rekrutierten Indexpersonen tendenziell mehr weibliche als männliche Patienten im Datensatz enthalten sind. Bei der Gesamtbetrachtung aller Betroffenen unserer Studiengruppe (328 Individuen) zeigt sich nur ein unwesentlicher Unterschied in der Zahl der betroffenen Männer und Frauen (Abb. 3.1.). Allgemein ist bekannt: Wenn sich bei der Psoriasis ein Unterschied der Krankheitshäufigkeit bei Männern und Frauen ergeben sollte, so ist dieser sehr gering (Lomholt, 1963; Henseler, 1993). Die tendenzielle Überzahl der Frauen bei den Indexpersonen lässt somit erkennen, dass es bei der Rekrutierung der Trios, auch wenn es nicht beabsichtigt war, dennoch zu einer leichten Selektion von Frauen gekommen sein muss. Für diese Beobachtung gibt es jedoch durchaus gute Erklärungsmöglichkeiten: Unsere Untersuchungen war auf die Mithilfe der

Bevölkerung angewiesen. Diese bestand darin, dass sich entsprechende Personen freiwillig zu einer Teilnahme an der Studie bereit erklärten. Aufgrund einiger Unterschiede im Verhalten von Frauen und Männern – vielleicht auch in Bezug auf deren Umgang mit der Hautkrankheit - ist es nicht ungewöhnlich, dass sich Frauen im Durchschnitt eher für eine Untersuchung bzw. derartige Studie und für ein Mitwirken daran interessierten als Männer.

Diese Erklärung passt nicht zu der Beobachtung, dass bei den 144 direkt familiären Trios tendenziell mehr paternale als maternale Trios vorliegen (paternale Trios 54,4 %; maternale Trios 45,6 %; Unterschied nicht signifikant; Abb. 3.4.b.). Da die Familien über die Kinder angesprochen wurden, lässt sich beim Sammeln der Trios kaum eine Selektion vorstellen, die zu einer Bevorzugung der Familien mit einem ebenfalls betroffenen Vater führte. Dieser Unterschied spricht vielmehr dafür, dass das relative Risiko, an Psoriasis vulgaris zu erkranken, für die Kinder betroffener Väter höher liegt als für die Kinder betroffener Mütter, wie dies von Traupe und Mitarbeitern (1992) und anderen Autoren schon gezeigt wurde. Diese Beobachtung könnte man daher, wenn auch nur andeutungsweise, als eine diskrete Bestätigung eines paternalen Effekts bei der Psoriasis ansehen. Die Effektgröße ist klein und in unserer Trio-Studiengruppe statistisch nicht signifikant. Ließe sich das bisherige Zahlenverhältnis auf eine 5x größere Gruppe (~ 500 Trios) extrapolieren, käme die Beobachtung des paternalen Effekts in einen signifikanten Bereich.

Dennoch, wie in Kapitel 1.8.1. und im oberen Abschnitt dargestellt wurde, erreicht der Hinweis auf einen paternalen Effekt bei der Psoriasis auch bei anderen kleinen Untersuchungen nicht immer den signifikanten Aussagebereich. Wieder einmal aber beobachten wir hier die Tendenz in paternale Richtung. Vergleicht man unsere Beobachtung zusammengenommen mit allen bisher in diesem Bereich erfolgten Untersuchungen, lässt sich annehmen, dass der vermutete paternale Effekt tatsächlich bei der Psoriasis vorhanden ist, wenn auch nicht sehr stark ausgeprägt. Dem Effekt muss somit auch ein molekularbiologischer Mechanismus zugrunde liegen. Traupe und Mitarbeiter (1992) vermuten, dass der beobachtete paternale Effekt auf der genomischen Prägung eines Suszeptibilitätsgens beruht. Inzwischen nimmt man an, dass dabei insbesondere die Methylierung von CpG-Inseln im Gen-Promotor-bereich eine wichtige Rolle spielt, wodurch es dann zu einer Reprimierung der Genexpression kommt (s. Kap. 1.4.3.). Ein paternaler Effekt könnte beispielsweise durch die Reprimierung eines maternal vererbten Suszeptibilitätsgens zu Stande kommen. Eine Übersicht zu diesen Zusammenhängen gibt Abbildung 4.2..

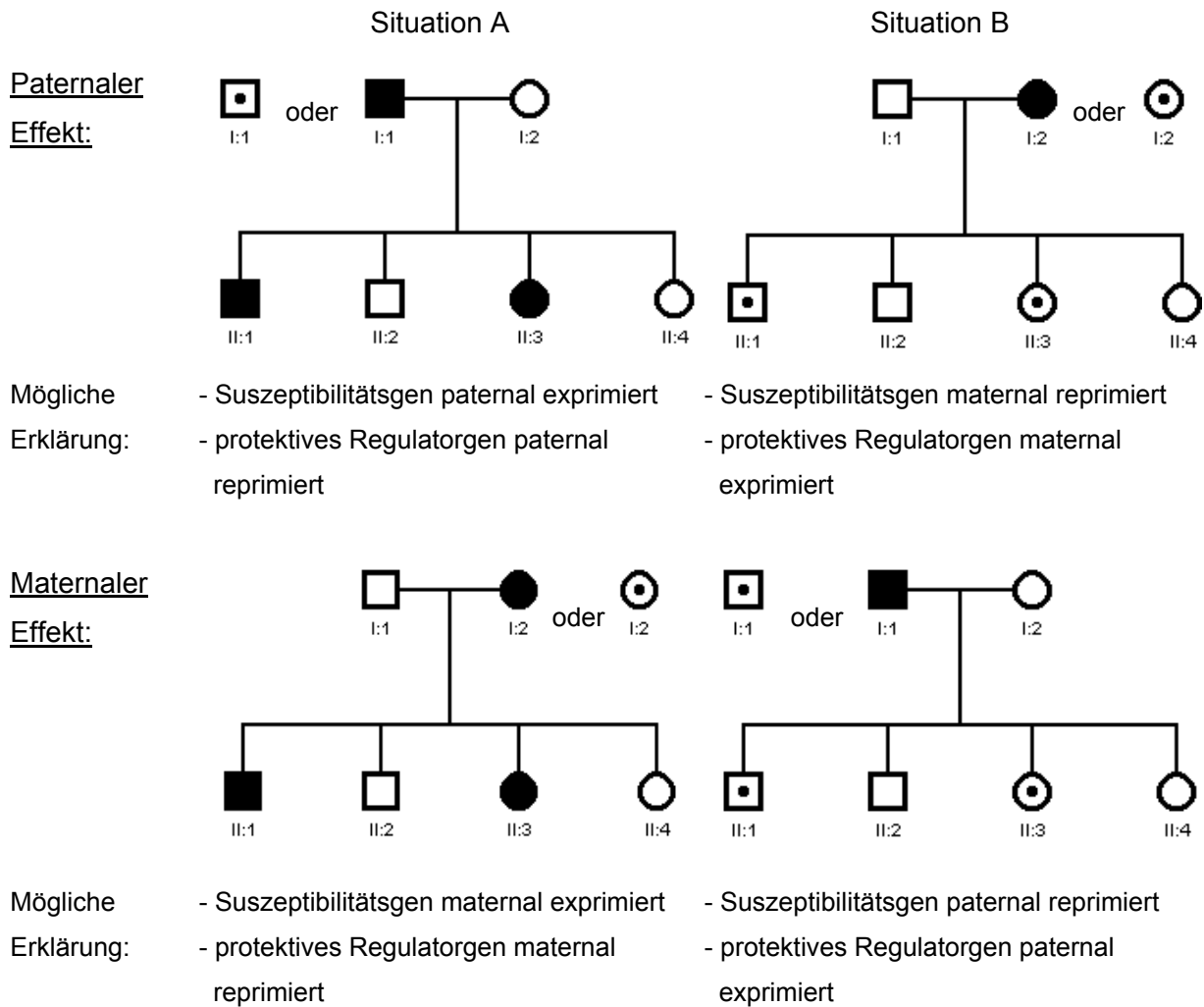


Abb. 4.2.: Idealisierte Stammbäume eines maternalen und paternalen Imprintings. Demnach hat ein maternales Imprinting beispielsweise zur Folge, dass sich der Phänotyp eines Suszeptibilitätsgens nicht entwickelt, wenn das Gen oder Allel maternal vererbt wird (maternales Imprinting → paternaler Effekt).

#### 4.3. Maternale versus paternale Transmission auf Ebene der Marker

Die genomische Prägung wird beim Menschen hauptsächlich mit einigen seltenen genetischen Syndromen, wie beispielsweise dem Prader-Willi- oder Angelman- Syndrom, in Verbindung gebracht. Bei genetisch komplexen Krankheiten wurde der „parent-of-origin effect“ bisher nicht systematisch auf molekularer Ebene untersucht. Gleichwohl hat sich inzwischen gezeigt, dass der *epigenetische Prozess*, der beim *Imprinting* eine Rolle spielt (Methylierung von CpG-Inseln der Promotor-Region), durchaus einen wesentlichen Anteil bei der Regulierung der Genexpression hat. Aus diesem Grund hat die nach der elterlichen Herkunft aufgeschlüsselte Analyse von Alleltransmissionen eine hohe Relevanz bei der Suche

nach Suszeptibilitätsgenen (Paterson, 1999). Krankheiten, die allgemein als multifaktoriell oder variabel in ihrer Penetranz beschrieben werden, könnten im besonderen Maße von einer genomischen Prägung beeinflusst werden (Hall, 1990). Dies trifft sicherlich auch für die Psoriasis vulgaris zu (Traupe et al., 1992). Hall (1990) macht in ihrer Arbeit darauf aufmerksam, dass man die dem Imprinting unterliegenden Segmente der Maus-Chromosomen auf die Chromosomen des Menschen extrapolieren kann, um damit Verdachtsregionen für dieses Phänomen beim Menschen festzustellen. Einer dieser Abschnitte erstreckt sich von 6pter bis p12. In diesem Bereich liegt auch der MHC mit dem PSORS1-Locus. Für das Gen HYMAI auf 6q24 (Arima et al., 2000) und den Locus des IDDM2 auf Chromosom 11p15.5 hat diese „Vorhersage von Imprinting“ bereits eine Bestätigung gefunden. In mehreren Untersuchungen wurde für das Insulin-Gen (IDDM2) eine erhöhte maternale Transmissionsrate festgestellt (Paterson et al., 1999).

Eine methodische Anleitung beim Vergleich maternalen und paternalen Transmissionen bezog ich aus der Arbeit von Bennett und Mitarbeitern (1997). In dieser wird die Transmissionsrate des sog. Allel 814 von heterozygoten 814/III-Eltern separat nach Vätern und Müttern untersucht. Allel 814 gehört zur Längen-Klasse I der *INS* VNTRs, die rezessiv zum IDDM Typ1 prädisponieren. VNTR-Allele der Längenklasse III dagegen wirken dominant protektiv. Die maternalen und paternalen Transmissionseignisse verglich man mit Hilfe des 2 x 2 Kontingenz-Tests auf Heterogenität, wobei sich mit einem  $p_{\text{het}}$ -Wert von 0,0017 ein eindeutiger maternaler Transmissionseffekt ergab. Bennett und Mitarbeiter (1997) folgerten daraus, dass das paternal vererbte Allel 814 der Klasse III-positiven Väter protektiv bei Diabetes wirkt.

Zunächst gingen wir nun der Frage nach, ob sich die maternale Transmissionsrate von CDSN\*1243 von der paternalen Transmissionsrate unterscheidet. Wir fanden bei CDSN\*1243 (C) bei 61 paternalen Transmissionen eine Transmissionsrate von 72,1 % ( $P = 0,00055$ ) und bei 69 maternalen Transmissionen eine Transmissionsrate von 63,8 % ( $P = 0,023$ ) (Tab. 3.9. a.). Die jeweiligen  $p$ -Werte unterscheiden sich voneinander um fast zwei 10er Potenzen, der  $p_{\text{het}}$ -Wert von 0,31 liegt dennoch nicht im signifikanten Bereich. Nur andeutungsweise zeigt sich ein Überwiegen der paternalen Transmissionen von Allel 2.

So wie es die Untersuchungen der bisherigen Studien und auch unser Ergebnis nahelegen (s. Kap. 4.1.), stellt das Corneodesmosin-Gen vermutlich nicht das Suszeptibilitäts-Gen für die Psoriasis auf Chromosom 6 (PSORS1) dar. Die nun zusätzlich durchgeführte parent-of-origin“-Analyse ergibt auch keinen signifikanten paternalen Transmissionsunterschied der beiden Allele.

Als zweites wurde das im TDT hochsignifikant häufiger transmittierte Allel 4 des anonymen Mikrosatelliten-Marker TN62 getrennt nach dessen elterlichen Herkunft untersucht. In den Ergebnissen (Tab. 3.10. a) zeigt sich gegenüber der paternalen Tendenz bei CDSN\*1243 (C) ein Überwiegen der maternalen Transmissionsrate von Allel 4. Bei insgesamt 27 maternalen Transmissionen fanden wir eine Transmissionsrate von 92,6 % ( $P = 0,96 \times 10^{-5}$ ) und bei 29 paternalen Transmissionen eine Transmissionsrate von 79,3 % ( $P = 0,00159$ ). Der Heterogenitätstest ergibt aber wiederum keinen signifikanten Wert ( $p_{\text{het.}} = 0,16$ ). Die  $p$ -Werte unterscheiden sich allerdings voneinander zumindest um mehr als zwei Potenzen und weisen darauf hin, dass das Allel 4 stärker mit der Psoriasis vulgaris assoziiert sein könnte, wenn es maternal und nicht paternal vererbt wird. Unter der Annahme, dass man die in unserer Gruppe von 55 Trios beobachtete Effektstärke auf eine 5x größere Großgruppe, wie sie beispielsweise von Bennett und Mitarbeitern (1997) verwendet wurde, extrapolieren könnte, ergäbe sich ein  $p_{\text{het.}}$  von 0,0015.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich CDSN\*1243 (C) und TN62 (Allel 4) in einem Kopplungsungleichgewicht mit PSORS1 befinden, wobei die beiden Markerallele aber möglicherweise nicht auf demselben Haplotyp liegen. Ansonsten würde man wohl keinen gegensätzlichen Transmissionseffekt erwarten, wie er sich andeutungsweise in dieser Untersuchung ergibt.

#### 4.4. Söhne versus Töchter bei der Vererbung der Psoriasis vulgaris und bei den Allel-Transmissionen der Marker CDSN\*1243 und TN62

Die in Kapitel 4.2. dargestellten Gegebenheiten in der Untersuchungsgruppe und insbesondere der auffallende Gegensatz „*mehr paternale Trios jedoch weniger männliche Indexpersonen*“ veranlassten mich, die Gruppe der 114 familiären Trios noch einmal genauer aufzuschlüsseln bzw. zu stratifizieren. In Tabelle 3.8. werden die Trios neben der Einteilung in maternal und paternal weiterhin getrennt nach dem Geschlecht der Indexperson betrachtet. U. a. könnte man mit dieser Unterteilung einen möglichen X- oder y-chromosomalen Effekt herausfinden. Tatsächlich ergeben sich bei der Stratifizierung einige interessante Beobachtungen.

Betrachtet man nur die männlichen Indexpersonen, zeigt sich, dass die Söhne die Krankheit signifikant häufiger von ihrem Vater erben als von ihrer Mutter (31 zu 16:  $P = 0,029$ ), während bei den Töchtern kein Transmissionsunterschied zwischen Vätern und Müttern gefunden wird. Bei der getrennten Betrachtung der maternalen Trios wird deutlich, dass die



Mütter mit einem  $P$  von 0,0056 wesentlich häufiger die Krankheit an eine Tochter weitergeben als an einen Sohn. Man könnte den Sachverhalt insgesamt auch so interpretieren, dass im Datensatz der 114 Trios scheinbar die „maternalen Trios mit männlicher Indexperson“ unterrepräsentiert vorhanden sind.

Da die Verteilung in der Tabelle nicht der erwarteten Verteilung entspricht ( $p_{het.}$ -Wert = 0,038), kann man die Beobachtung nicht so einfach als Stratifizierungsartefakt abtun.

Man hätte erwartet, dass sich das Geschlechtsverhältnis von Jungen zu Mädchen bei den Indexpersonen der maternalen Trios nicht wesentlich voneinander unterscheidet; wir finden aber ein M : F von 1 : 2,25, während das Geschlechtsverhältnis bei allen Indexpersonen 1 : 1,2 beträgt. Es fällt ins Auge, dass bei den paternalen Trios das Geschlechtsverhältnis M : F = 1 : 1 beträgt und somit der a-priori-Erwartung entspricht. Ebenfalls kann man feststellen, dass sich aufgrund dieser Verteilung ein paternaler Effekt ausschließlich bei den Söhnen zeigt ( $p = 0,029$ ). In der Gesamtgruppe, d. h. bei Söhnen und Töchtern, kommt der paternale Effekt nicht mehr signifikant zum Vorschein (s. Kap. 4.2.).

Die gefundenen Unterschiede im Geschlechtsverhältnis bei den Kindern betroffener Mütter lassen an die Beteiligung eines X- oder y-chromosomalen Gens denken, das vielleicht nur in einem „Subset“ von Psoriasis-Familien bedeutsam ist. Eine alternative, aber vielleicht auch etwas „herbeigeholte“ Erklärung wäre eine *Segregationsdistorsion* aufgrund eines „meiotic drive“, wie dies z. B. für die kongenitale myotonische Dystrophie (Magee und Hughes, 1998) oder für die auf Chromosom 19q gelegene Kegel-Stab retinale Dystrophie (Evans et al., 1994) diskutiert wird.

Die Vermutung, dass die Vererbung der klinisch manifesten Psoriasis zum Teil vom Geschlecht der Indexperson beeinflusst wird, wird des weiteren durch die Untersuchung der Alleltransmissionen der Marker CDSN\*1243 und TN62 mit der Unterscheidung Index-Sohn versus Index-Tochter unterstützt (Tab. 3.11. und Tab. 3.12.).

Bei CDSN\*1243 zeigt sich bei den insgesamt 57 Index-Söhnen eine Transmission des Risiko-Allels zu 59,7 % ( $P = 0,15$ ) und bei den 73 Index-Töchtern eine Transmission von 74,0 % ( $P = 0,000042$ ). Der Unterschied ergibt im  $\chi^2$ -Unabhängigkeitstest ein schwach signifikanten Wert von  $p_{het.} = 0,083$ . Bei TN62 findet die Transmission des Allel 4 bei den 23 Söhnen zu 73,9 % statt ( $P = 0,018$ ) und bei den 33 Töchtern zu 93,9 % ( $P = 0,45 \times 10^{-6}$ ). Dieser Unterschied ist mit einem  $p_{het.}$ -Wert von 0,035 statistisch abgesichert.

Insgesamt sollten diese Beobachtungen in einer Folgestudie überprüft werden; wir können sie im Moment nicht schlüssig erklären. Nicht völlig auszuschließen sind denkbare Verzerrungen bei der Rekrutierung der Familien.

#### 4.5. Aktualisierung und Zusammenfassung der Diskussionspunkte

In einer Assoziationsanalyse auf Basis von SNP-Haplotypen wurde jüngst ein 10 kb langer PSORS1-Risiko-Haplotyp identifiziert, der mit seinen beiden Hauptallelen Nr.7 und Nr.9 (Assoziation mit Psoriasis vulgaris beide je  $P > 10^{-9}$ ) 7 bzw. 4 kb proximal von HLA-C liegt (Veal, et al., 2002). Dieser Haplotyp ist deutlich stärker mit Psoriasis assoziiert als alle anderen untersuchten Haplotypen. Der DNA-Abschnitt von 10 kb kodiert sehr wahrscheinlich nicht für ein Protein. Diese Arbeit, bei der 171 europäische Trio-Familien und je 77 indische Fall- bzw. Kontrollpersonen untersucht wurden, verdeutlicht, dass sich der MHC aus bestimmten „Haplotyp-Clustern“ zusammensetzt. Dabei zeichnet sich ab, dass die HLA-C- und CDSN-Haplotypen offensichtlich auf unterschiedlichen „Blöcken“ lokalisiert sind. Dieser Befund paßt sehr gut zu unserer Vermutung, dass TN62 und CDSN wahrscheinlich auf unterschiedlichen „Haplotypen“, d. h. Blöcken, lokalisiert sind (s. Kap. 4.3.).

Die paternal und maternal durchgeführten Transmissionsanalysen in Erweiterung des TDTs sollten bei zukünftigen genetische Untersuchungen mit größeren Psoriasis-Studienkollektiven fortgeführt werden. Im MHC könnte ein *maternaler Transmissionseffekt* bedeutsam sein. An die Einflüsse einer *Segregationsdistorsion* im MHC oder an die mögliche Beteiligung eines *X-chromosomalen* Gens sollte gedacht werden, wenn sich in weiteren Untersuchungen der Befund bestätigt, dass es vor allem Töchter sind, an die die Risiko-Allele transmittiert werden.

Besonders interessant erscheint mir die Frage, ob sich eventuell auch Konsequenzen für die Interaktionsanalysen mit Loci auf anderen Chromosomen ergeben, wenn der „parent-of-origin“-Effekt mitberücksichtigt wird. Unter Umständen lassen sich auf diese Art und Weise vermutete Zusammenhänge der verschiedenen Suszeptibilitäts-Loci, ausgehend vom PSORS1-Locus auf 6p21, besser erkennen, z. B. zwischen Chromosom 6 und Chromosom 19 (PSORS6) oder Chromosom 6 und Chromosom 1 (PSORS4). Als Beispiel für Imprinting beeinflusste Interaktionen könnte man sich den Mechanismus des „*insulin like growth factor 2*“ der Maus vor Augen halten: *Igf2* wird bei der Maus paternal exprimiert und dessen

zugehöriger den Abbau vermittelnder Rezeptor *M6p/Igf2r* nur maternal. Durch diese gegenläufige Expression wird der potente Wachstumsfaktor *Igf2* reguliert und quasi „in Schach“ gehalten. Ein Wegfall der maternal exprimierten „Bremse“ führt zu einem Bild des „fetal overgrowth“ (John und Surani, 2000).

Man könnte sich fragen, ob das Proliferationsgleichgewicht der Epidermis – im weitesten Sinne - vielleicht ähnlich gesteuert ist und ob es hier ebenfalls ein paternal exprimierte Wachstumsgen und ein maternales „Abbau/Brems“-Gen gibt. In diesem Fall wäre die Berücksichtigung des „parent-of-origin“-Effekt bei der Aufklärung der Psoriasisgenetik sehr wichtig.

## 5. Literaturverzeichnis

- 1. Abele, D. C., Dobson, R. L., Graham, J. B.**  
Heredity and Psoriasis  
*Arch Dermatol* 88: 38 – 47, 1963
- 2. Abreu, P. C., Greenberg, D. A., Hodge, S. E.**  
Direct power comparisons between simple LOD scores and NPL scores for linkage analysis in complex diseases  
*Am J Hum Genet* 65: 847 – 857, 1999
- 3. Allen, M. H., Veal, C., Faassen, A., Powis, S. H., Vaughan, R. W., Trembath, R. C., Barker, J. N.**  
A non-HLA gene within the MHC in psoriasis  
*Lancet* 353: 1589 – 1590 (letter), 1999
- 4. Altman, E. M., and Kamino, H.**  
Diagnosis: Psoriasis or Not? What are the Clues?  
*Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 18, No. 1: 25 – 35, 1999
- 5. Altmeyer, P., Nüchel, C.M.**  
Fumarate zur Behandlung der Psoriasis  
*Deutsches Ärzteblatt* 93(48): B-2489 – 2491, 1996
- 6. Andressen C., Henseler, T.**  
Erblichkeit der Psoriasis. Eine Analyse von 2035 Familienanamnesen.  
*Hautarzt* 33(4): 214 – 7, 1982
- 7. Arima, T., Drewell, R. A., Oshimura, M., Wake, N., Surani, M. A.**  
A novel imprinted gene, HYMAI, is located within an imprinted domain on human chromosome 6 containing ZAC  
*Genomics* 67(3): 248 – 55, 2000
- 8. Asahina, A., Akazaki, S., Nakagawa, H., et al.**  
Specific nucleotide sequence of *HLA-C* is strongly associated with psoriasis vulgaris  
*J Invest Dermatol* 97: 254 – 258, 1991
- 9. Asumalahti, K., Laitinen, T., Itkonen-Vatjus, R., et al.**  
A candidate gene for psoriasis near *HLA-C*, *HCR* (Pg8), is highly polymorphic with a disease-associated susceptibility allele  
*Hum Mol Genet* 9, No. 10: 1533 – 1542, 2000
- 10. Baker, B. S., Fry, L.**  
The immunology of psoriasis.  
*Br J Dermatol* 126: 1 – 9, 1992
- 11. Baker, B. S., Swain, A. F., Fry, L., Valdimarsson, H.**  
Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis  
*Brit J Dermatol* 110(5): 555 – 64, 1984

12. **Balendran, N., Clough, R. L., Arguello, J. R., et al.**  
 Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3.  
*J Invest Dermatol* 113: 322 – 8, 1999
  
13. **Barker, J. N. W. N.**  
 The pathophysiology of psoriasis  
*Lancet* 338: 227 – 338, July 1991
  
14. **Barker, J. N. W. N., Mitra, R. S., Griffiths, C. E. M., et al.**  
 Keratinocytes as initiators of inflammation  
*The Lancet* 337: 211 –214, Jan. 1991
  
15. **Barker, J. N. W. N., Karabin, G. D., Stoof, T. J., et al.**  
 Detection of interferon-gamma mRNA in psoriatic epidermis by polymerase chain reaction  
*J Dermatol Sci* 2: 106 – 11, 1991
  
16. **Barlow, D. P.**  
 Imprinting: a gamet's point of view  
*TIG* 10, No. 6: 194 – 199: 1994
  
17. **Bennett, S. T., Wilson, A. J., Esposito, L., et al.**  
 Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele  
*Nature Genetics* 17: 350 –352, 1997
  
18. **Bhalerao, J., and Bowcock, A. M.**  
 The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system (Review)  
*Hum Mol Genet* 7 No. 10: 1537 – 1545, 1998
  
19. **Bonish, B., Jullien, D., Dutronc, Y., et al.**  
 Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells  
*J Immunol* 165(7): 4076 – 85, 2000
  
20. **Boyd, A., Neldner, K. H.**  
 The Isomorphic Response of Koebner (Review)  
*Internat J Dermatol* 29 No 6: 401 – 410, 1990
  
21. **Brandrup, F., Green, A.**  
 The Prevalence of Psoriasis in Denmark  
*Acta Dermatovener* 61: 344 – 346, 1981
  
22. **Brandrup, F., Hauge, M., Henningsen, K., Eriksen, B.**  
 Psoriasis in an unselected series of twins.  
*Arch-Dermatol* 114: 874 – 8, 1978
  
23. **Braun-Falco, O., Plewig, G., und Wolff, H. H.**  
 Dermatologie und Venerologie, S. 541 ff  
*Springer, 4. Aufl., 1995*

- 24. Brenner, W., Gschnait, F., Mayr, W. R.**  
HLA B13, B17, B37 and Cw6 in Psoriasis vulgaris: association with the Age of Onset  
*Arch Dermatol Res* 262: 337 – 339, 1978
- 25. Broman, K. W., Weber, J. L.**  
Method for constructing confidently ordered linkage maps  
*Genet Epidemiol* 16(4): 337 – 43, 1999
- 26. Burden, A. D., Javed, S., Bailey, M., Hodgins, M., Connor, M., Tillman, D.**  
Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p  
*J Invest Dermatol* 110: 958 – 960, 1998
- 27. Butler, M. G., Meany, F. J., Palmer, C. G.**  
Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome  
*Am J Med Genet* 23: 793 – 809, 1986
- 28. Camisa, C.**  
Psoriasis, S.79  
*Blackwell Scientific Publications, Boston etc., 1994*
- 29. Camp, R. D. R.**  
Psoriasis. In Champion, R. H. , Burton, J. L., und Ebeling, F. J. G. (eds)  
*Textbook of Dermatology, Blackwell, Oxford, S. 1391 - 1392*
- 30. Capon, F., Novelli, G., Semprini, S., Clementi, M., Nudo, M., Vultaggio, P., Mazzanti, C., et al.**  
Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1.  
*J Invest Dermatol* 112: 32 – 35, Jan. 1999
- 31. Capon, F., Semprini, S., Dallapiccola, B., Novelli, G.**  
Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21 (*Letter*)  
*Am J Hum Genet* 65: 1798 – 1800, 1999
- 32. Carroll, J. M., Romero, M. R., Watt, F. M.**  
Suprabasal Integrin expression in the epidermis of transgenic mice results in developmental defects and a phenotyp resembling psoriasis  
*Cell* 83: 957 – 968, 1995
- 33. Cattanach, B. M., and Kirk, M.**  
Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice  
*Nature* 315: 496 – 498, 1985
- 34. Chaturvedi, V., Qin, J. Z., Denning M. F., Choubey, D., et al.**  
Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes  
*J Biol Chem* 274 (33): 23358 – 67, 1999

- 35. Chodorowska, G.**  
Plasma concentrations of IFN-gamma and TNF-alpha in psoriatic patients before and after local treatment with dithranol ointment  
*J Eur Acad Dermatol Venereol* 10 (2): 147 – 51, 1998
- 36. Christophers, E., Henseler, T.**  
Patient subgroups and inflammatory pattern in psoriasis  
*Acta Dermatol Venerol* 69: 88 – 92, 1989
- 37. Christophers, E., Mrowietz, U.**  
Psoriasis – ein vielgestaltiges Krankheitsbild  
*Deutsches Ärzteblatt* 96(36): C 1651 – 1656, 1999
- 38. Collins, A., Lonjou, C., Morton, N. E.**  
Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms  
*Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15173 – 15177, 1999
- 39. Cook, P. W., Piepkorn, M., Clegg, C. H., Plowman, G. D., et al.**  
Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype  
*J Clin Invest* 100(9): 2286 – 94, 1997
- 40. Crouse, H. V.**  
The controlling element in sex chromosome behaviour in *Sciara*  
*Genetics* 45: 1429 - 1443, 1960
- 41. Curtis, D., and Sham, P. C.**  
A note on the application of the transmission disequilibrium test when a parent is missing  
*Am J Hum Genet* 56: 811 – 812, 1995
- 42. Dausset, J.**  
Iso-leuko-anitcorps  
*Acta haematol* 29: 156 – 166, 1958
- 43. Dib, C., Fauré, S., Fizames, C., Samson, D., et al.**  
A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites  
*Nature* 380: 152 – 154, 1996
- 44. Degli-Eposti, M. A., Leaver, A. L., Christiansen, F. T., Witt, C. S., Abraham, L. J., Dawkins, R. L.**  
Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes  
*Hum Immunol* 34(4): 242 – 52, 1992
- 45. Duvic, M., Johnson, T. M., Rapini, R. P.**  
Acquired Immunodeficiency Syndrome – Associated Psoriasis and Reiter's Syndrome  
*Arch Dermatol* 123, 1622 – 1632, 1987
- 46. Elder, J. T., Nair, R. P., Guo, S.-W., et al.**  
The Genetics of Psoriasis  
*Arch Dermatol* 130: 216 – 224: 1994

- 47. Ellis, C. N., Gorsulowsky, D. C., Hamilton, T. A., Billings, J. K., Brown, M. D., et al.**  
Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study  
*JAMA* 256(22): 3110 – 6, 1986
- 48. Enerbäck, C., Enlund, F., Inerot, A., Samuelsson, L., et al.**  
S Gene (Corneodesmosin) Diversity and its Relationship to Psoriasis; High Content of cSNP in the HLA-Linked S Gene  
*J Invest Dermatol* 114(6), 1158 – 1163, 2000
- 49. Enlund, F., Samuelsson, L., Enerback, C., Inerot, A., Wahlstrom, J., Yhr, M., Torinsson, A., Martinsson, T., Swanbeck, G.**  
Analysis of three suggested psoriasis susceptibility loci in a large Swedish set of families: confirmation of linkage to chromosome 6q (HLA region), and to 17q, but not to 4q  
*Hum Hered* 29(1): 2 – 8, Jan. 1999
- 50. Enlund, F., Samuelsson, L., Enerback, C., Inerot, A., Wahlstrom, J., Yhr, M., Torinsson, A., et al.**  
Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden.  
*Eur J Hum Genet* 7: 783 – 790, April 1999
- 51. Falk, C. T., Rubinstein, P.**  
Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations  
*Ann Hum Genet* 51: 227 – 33, 1987
- 52. Farber, E. M., Bright, R. D., Nall, M. L.**  
Psoriasis: A questionnaire survey of 2,144 patients  
*Arch Derm* 98: 248 – 259, 1968
- 53. Farber, E. M., Nall, M. L.**  
The natural history of psoriasis in 5,600 patients  
*Dermatologica* 148(1): 1 – 18, 1974
- 54. Farber, E. M., Nall, M. L.**  
Psoriasis in the Tropics: Epidemiology, Genetic, Clinical and Therapeutic Aspects  
*Contemporary tropical dermatology* 12(4): 805 – 816, 1994
- 55. Farber, E. M., Nall, M. L., Watson, W.**  
Natural history of psoriasis in 61 twin pairs.  
*Arch Dermatol* 109: 207 – 211, 1974
- 56. Favre, M., Orth, G., Majewski, S., Baloul, S., Pura, A., Jablonska, S.**  
Psoriasis: A possible reservoir for human papillomavirus type 5, the virus associated with skin carcinomas of epidermodysplasia verruciformis  
*J Invest Dermatol* 110(4): 311 – 7, 1998



- 57. Field, L.L., Fothergill-Payne, C., Bertrams, J., Baur, M. P.**  
HLA-DR effects in a large German IDDM dataset  
*Genet Epidemiol Suppl 1: 323 – 328, 1986*
- 58. Fritsch, Peter**  
Dermatologie und Venerologie - Lehrbuch und Atlas, S. 335 ff  
*Springer Verlag, 1998*
- 59. Gaston, L., Lassonde, M., Bernier-Buzzanga, J., Hodgins, S., Crombez, J.-C.**  
Psoriasis and stress : A prospective study  
*J Am Acad Dermatol 17(1): 82 – 86, 1987*
- 60. Gonçalo, R. A., Noguchi, E., Heinzmann, A., Traherne, J. A., Bhattacharyya, S., Leaves, N. I., et al.**  
Extent and distribution of linkage disequilibrium in three genomic regions  
*Am J Hum Genet 68: 191 – 197, 2001*
- 61. Gottlieb, A. B., Grossman, R. M., Khandke, L., Carter, D. M., Sehgal, P. B., Fu, S. M., Granelli-Piperno, A., Rivas, M., et al.**  
Studies of the effect of cyclosporine in psoriasis in vivo: combined effects on activated T lymphocytes and epidermal regenerative maturation  
*J Invest Dermatol 98(3): 302 – 9, 1992*
- 62. Gottlieb, S. L., Gilleaudeau, P., Johnson, R., Estes, L., Woodworth, T. G., Gottlieb, A. B., Krueger, J. G.**  
Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis  
*Nat Med 1(5): 442 – 7, 1995*
- 63. Griffiths, C. E., Voorhees, J. J., Nickoloff, B. J.**  
Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor  
*J Am Acad Dermatol 20(4): 617 – 29, 1989*
- 64. Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., et al.**  
Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes  
*Proc Natl Acad Sci USA 86(16): 6367 – 71, 1989*
- 65. Guerrin, M., Simon, M., Montezin, M., Vincent, C., Serre, G.**  
Expression cloning of human corneodesmosin proves its identity with the product of the S gene and allows improved characterization of its processing during keratinocyte differentiation.  
*J Biol Chem 273: 22640 – 7, 1998*
- 66. Gunawardena, D. A., Gunawardena, K. A., Vasanthanathan, N. S., Gunawardena, J. A.**  
Psoriasis in Sri-Lanka – a computer analysis of 1366 cases  
*Brit J Dermatol 98: 85 – 96: 1978*

- 67. Gupta, M. A., Schork, N. J., Gupta, A. K., Ellis, C. N.**  
Alcohol intake and treatment responsiveness of psoriasis: A prospective study  
*J Am Acad Dermatol* 28: 730 – 2, 1993
- 68. Haftek, M., Serre, G., Mils, V., Thivolet, J.**  
Immunocytochemical evidence for a possible role of cross-linked keratinocyte envelopes in stratum corneum cohesion  
*J Histochem Cytochem* 39(11): 1531 – 8, 1991
- 69. Haig, D., and Graham, C.**  
Genomic Imprinting and the Strange Case of the Insulin-like Growth Factor II Receptor  
*Cell* 64: 1045 – 1046, 1991
- 70. Hall, Judith G.**  
Genomic Imprinting: Review and Relevance to Human Diseases  
*Am J Hum Genet* 46: 857 – 873, 1990
- 71. Happle, R.**  
Somatic recombination may explain linear psoriasis  
*J Med Genet* 28: 337, 1991
- 72. Hardas, B. D., Zhao X., Zhang, J., et al.**  
Assignment of psoriasis to human chromosomal band 1q21: coordinate overexpression of clustered genes in psoriasis  
*J Invest Dermatol* 106: 753 – 758, 1996
- 73. Heilig, B., Gause, A., Staib, P., Diehl, V.**  
Einführung in die klinische Immunologie  
In: Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K., S. 435 ff  
*Innere Medizin, 4. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München... ,1998*
- 74. Henseler, T., Christopher, E.**  
Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris  
*J-Am-Acad-Dermatol* 13: 450 – 456, 1985
- 75. Hertle, M. D., Jones, P. H., Groves, G. W., Hudson, D. L., Watt, F. M.**  
Integrin expression by human epidermal keratinocytes can be modulated by interferon-gamma, transforming growth factor-beta, tumor necrosis factor-alpha, and culture on a dermal equivalent  
*J Invest Dermatol* 104(2): 1995
- 76. Holmes, W. E., Lee, J., Kuang, W. J., Rice, G. C., Wood, W. I.**  
Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor  
*Science* 253(5025): 1278 – 80, 1991
- 77. Horvath, S., Laird, N. M., Knapp, M.**  
The Transmission/Disequilibrium Test and Parental-Genotype Reconstruction for X-Chromosomal Markers  
*Am J Hum Genet* 66: 1161 – 1167, 2000

- 78. Ikäheimo, I., Silvennoinen-Kassinen, S., Karvonen, J., Järvinen, T., Tiilikainen, A.**  
 Immunogenetic profile of psoriasis vulgaris: association with haplotypes A2, B12, Cw6, DR7, DQA1\*0201 and A1, B17, Cw6, DR7, DQA1\*0201  
*Arch Dermatol Res* 288: 63 – 67, 1996
- 79. Ishihara, M., Yamagata, N., Ohno, S., et al.**  
 Genetic polymorphisms in the keratin-like S gene within the human major histocompatibility complex and association analysis on the susceptibility to psoriasis vulgaris  
*Tissue Antigens* 48: 182 – 186, 1996
- 80. Jeffreys, A. J., Royle, N. J., Wilson, V., Wong, Z.**  
 Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA  
*Nature* 332: 278 – 281, 1988
- 81. Jenisch, S., Henseler, T., Nair, R. P., et al.**  
 Linkage analysis of human leukocyte antigen (HLA) markers in familial psoriasis: strong disequilibrium effects provide evidence for a major determinant in the HLA-B/-C region  
*Am-J-Hum-Genet* 63: 191 – 199, Mai 1998
- 82. Jenisch, S., Koch, S., Henseler, T., et al.**  
 Corneodesmosin gene polymorphism demonstrates strong linkage disequilibrium with HLA an association with psoriasis vulgaris  
*Tissue Antigens* 54: 439 – 449, 1999
- 83. Jenisch, S., Westphal, E., Nair, R. P., et al.**  
 Linkage disequilibrium analysis of familial psoriasis: identification of multiple disease-associated MHC haplotypes  
*Tissue Antigens* 53: 135 - 146, Nov. 1998
- 84. John, R. M. and Surani, M. A.**  
 Genomic Imprinting, Mammalian Evolution, and the Mystery of Egg-Laying Mammals  
*Cell* 101: 585 – 588, 2000
- 85. Johnson, T. M., Duvic, M.; Rapini, R. P., Rios, A.**  
 AIDS exacerbates psoriasis  
*N Engl J Med (letter)* 313(22): 1415, 1985
- 86. Jorde, L. B., Bamshad, M., Rogers, A. R.**  
 Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution  
*Bioessays* 20: 126 – 136, 1998
- 87. Jorde, L. B., Carey, J. C., White, R. L.**  
 Gene Mapping, S. 129 ff  
 In: Medical Genetics  
 Mosby, St. Louis, 1995

- 88. Kadunce, D. P., Krueger, G. G.**  
Pathogenesis of psoriasis  
*Dermatol Clin* 13(4): 723 – 37, 1995
- 89. Karason, A., Gudjonsson, J. E., Upmanyu, R., Gulcher, J. R., et al.**  
A susceptibility gene for psoriatic arthritis maps to chromosome 16q: Evidence for Imprinting  
*Am. J. Hum. Genet.* 72: 125 – 131, 2003
- 90. Kelley, S. E., Antonovics, J., Schmitt, J.**  
A test of the shortterm advantage of sexual reproduction  
*Nature* 331: 714 – 716, 1988
- 91. Knapp, M.**  
The Transmission/Disequilibrium Test and Parental-Genotype Reconstruction: The Reconstruction-Combined Transmission/Disequilibrium Test  
*Am J Hum Genet* 64: 861 – 870, 1999
- 92. Knoll, J. H. M., Nicholls, R. D., Magenis, R. E., et al.**  
Angelman and Prader-Willi Syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion  
*Am J Med Genet* 32: 285 – 290, 1989
- 93. Knippers, R.**  
Molekulare Genetik, S. 450 ff  
*G. Thieme, 6. Aufl., 1995*
- 94. Krueger, G. G., Duvic, M.**  
Epidemiology of psoriasis: clinical issues  
*J Invest Dermatol* 102: No. 6 Supplement, 14 S – 18 S, 1994
- 95. Kruglyak, L., Daly, M. J., Reeve-Daly, M. P., and Lander, E. S.**  
Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach  
*Am J Hum Genet* 58: 1347 – 1363, 1996
- 96. Lako, M., Ramsden, S., Duncan Campbell, R., Strachan, T.**  
Mutation screening in British 21-hydroxylase deficiency families and development of novel microsatellite based approaches to prenatal diagnosis  
*J Med Genet* 36: 119 – 124, 1999
- 97. Lanzavecchia, A.**  
Immunology. Licence to kill  
*Nature* 393 (6684): 413 – 4, 1998
- 98. Lander, E., and Kruglyak, L.**  
Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results  
*Nature Genet* 11: 241 – 247, 1995

- 99. Lander, E. S., Schork, N. J.**  
Genetic dissection of complex traits  
*Science* 265: 2037 – 2048, 1994
- 100. Lawler, S. D., Povey, S., Fisher, R. A., Pickthal, V. J.**  
Genetic studies on hydatidiform moles/ II. The origin of complete moles  
*Ann Hum Genet* 46: 209 – 222, 1982
- 101. Leder, R. O., Hodge, S. E.**  
Familial psoriasis and HLA-B: unambiguous support for linkage in 97 published families  
*Hum Hered* 48(4): 198 – 211, 1998
- 102. Lee, F. I., Bellary, S. V., Francis, C.**  
Increased occurrence of psoriasis in patients with Crohn's disease and their relatives  
*Am J Gastroenterol* 85(8): 962 – 3, 1990
- 103. Lee, Y.-A., Rüschen-dorf, F., Traupe, H., et al.**  
Genomwide scan in german families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13  
*Am J Hum Genet* 67: 1020 – 124, 2000
- 104. Lehmann, P., Ruzicka, T.**  
Neue Entwicklungen in der Psoriasis-therapie  
*Deutsches Ärzteblatt* 93 (48), B 2484 – B 2488, 1996
- 105. Levy, R., Jais, J. P., Tourani, J. M., Even, P., Andrieu, J. M.**  
Long-term follow-up of HIV positive asymptomatic patients having received cyclosporine A  
*Adv Exp Med Biol* 374: 229 – 34, 1995
- 106. Lindelof, B., Eklund, G., Liden, S., Stern, R. S.**  
The prevalence of malignant tumors in patients with psoriasis  
*J Am Acad Dermatol* 22(6 Pt 1): 1056 – 60, 1990
- 107. Luger, T. A., Schwarz, T.**  
Zytokine  
In: Licht und Haut: Macher, E., Kolde, G., Bröcker, E. B.  
*Jahrbuch der Dermatologie, Biermann, 1993*
- 108. Lundstrom, A., Serre, G., Haftek, M., Egelrud, T.**  
Evidence for a role of corneodesmosin, a protein which may serve to modify desmosomes during cornification, in stratum corneum cell cohesion and desquamation  
*Arch Dermatol Res* 286(7): 369 – 75, 1994
- 109. Magee, A. C., Hughes, A. E.**  
Segregation distortion in myotonic dystrophy  
*J Med Genet* 35: 1045 – 1046, 1998

- 110. Majewski, S., Favre, M., Orth, G., Jablonska, S.**  
Is human papillomavirus type 5 the putative autoantigen involved in psoriasis?  
*J Invest Dermatol (letter) 110(3):541 - 542, 1998*
- 111. Majewski, S., Jablonska, S., Favre, M., Ramoz, N., Orth, G**  
Papillomavirus and autoimmunity in psoriasis  
*Immunol Today 20(10): 475f, 1999*
- 112. Mallon, E., Bunce, M., Wojnarowska, F., Welsh, K.**  
HLA-CW\*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriatics  
*J Invest Dermatol 109: 183 -186, 1997*
- 113. Matthews, D., Fry, L., Powles, A., Weissenbach, J., Williamson, R.**  
Confirmation of genetic heterogeneity in familial psoriasis  
*J Med Genet 32: 546 - 548, 1995*
- 114. Matthews, D., Fry, L., Powles, A., et al.**  
Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q  
*Nature Genetics 14: 231 - 233, 1996*
- 115. McFadden, J., Valdimarsson, H., Fry, L.**  
Cross-reactivity between streptococcal M surface antigen and human skin  
*Brit J Dermatol 125: 443 - 447, 1991*
- 116. Mertes, G., Schäfer, T., Schild, T. A., Schmidt, G., Schuster, D., vom Stein, J.**  
Automatische genetische Analytik  
*VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1997*
- 117. Metzger, A. L., Morris, R. I., Bluestone, R., Tersaki, P. I.**  
HL-A W27 in psoriasis arthropathy  
*Arthritis Rheum 18(2): 111 - 5, 1975*
- 118. (The) MHC sequencing consortium**  
Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex  
*Nature 401(28) (letter): 921 - 923, 1999*  
(Siehe auch: <http://www.sanger.ac.uk/HGP/Chr6/MHC.shtml>)
- 119. Mills, C. M., Srivastava, E. D., Harvey, I. M., et al.**  
Smoking habits in psoriasis: a case control study  
*Brit J Dermatol 127: 18 - 21, 1992*
- 120. Morton, N. E.**  
Sequential tests for the detection of linkage  
*Am J Hum Genet 7: 277- 318, 1955*
- 121. Nair, R. P., Guo, S.-W., Jenisch, S., Henseler, T., et al.**  
Scanning chromosome 17 for psoriasis susceptibility: lack of evidence for a distal 17q locus  
*Hum Hered 45: 219 - 230, 1995*

- 122. Nair, R. P., Henseler, T., Jenisch, S., Stuart, P., Christopher, K., et al.**  
Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan  
*Hum Mol Genet* 6: 1349 – 1356, 1997
- 123. Nair, R. P., Stuart, P., Henseler, T., Jenisch, S., Chia, N. V. C., et al.**  
Localisation of Psoriasis-Susceptibility Locus PSORS1 to a 60-kb Interval Telomeric to HLA-C  
*Am J Hum Genet* 66: 1833 – 1844, 2000
- 124. Nakagawa, H., Asahina, A., Akazaki, S., Tokunaga, K., Matsuki, K., et al.**  
Association of Cw11 in Japanese patients with psoriasis vulgaris  
*Tissue Antigens* 36(5): 241 – 2, 1990
- 125. Naldi, L., Parazzini, F., Brevi, A., Peserico, A., Fornasa, C. V., et al.**  
Family history, smoking habits, alcohol consumption and risk of psoriasis  
*Brit J Dermatol* 127: 212 – 217, 1992
- 126. Naukkarinen, A., Nickoloff, B. J., Farber, E. M.**  
Quantification of cutaneous sensory nerves and their substance P content in psoriasis  
*J Invest Dermatol* 92(1): 126 – 9, 1989
- 127. National Center for Biotechnology Information (NCBI)**  
Corneodesmosin-Nukleotidsequenz → GI: 2921269 (GenBank, Aug. 2000)  
Corneodesmosin-Aminosäuresequenz → GI: 4502759 (GenPept, Mar. 1999)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 128. Nevitt, G. J., Hutchinson, P. E.**  
Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease  
*Brit J Dermatol* 135: 533 – 537, 1996
- 129. Nickoloff, B. J.**  
The immunologic and genetic basis of psoriasis (review)  
*Arch Dermatol* 135: 1104 – 1110, Sept. 1999
- 130. Nickoloff, B. J., Bonish, B., Huang, B. B., Porcelli, S. A.**  
Characterization of a T cell line bearing natural killer receptors and capable of creating psoriasis in a SCID mouse model system  
*J Dermatol Sci* 24(3): 212 – 225, Dec. 2000
- 131. Nickoloff, B. J., von den Driesch, P., Raychaudhuri, S. P., Boehncke, W.-H., Morhenn, V. B., Farber, E. M., Holick, M. F., Schröder, J. M.**  
Controversies in Experimental Dermatology  
Is psoriasis a T-cell disease?  
*Exp Dermatol* 9: 359 – 375, 2000
- 132. Nickoloff, B. J., Wrone-Smith, T.**  
Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis  
*Am J Pathol* 155(1): 145 – 58, 1999

- 133. Nickoloff, B. J., Wrono-Smith, T., Bonish, B., Porcelli, S. A.**  
Response of murine and normal human skin to injection of allogeneic blood-derived psoriatic immunocytes: detection of T cells expressing receptors typically present on natural killer cells, including CD94, CD158, and CD161  
*Arch Dermatol* 135(5): 546 – 52, May 1999
- 134. Nyfors, A., Lemholt, K.**  
Psoriasis in children: A short review and a survey of 245 cases  
*Brit J Dermatol* 92: 437 – 442, 1975
- 135. Ockenfels, H. M., Schultewolter, T., Ockenfels, G., Funk, R., Goos, M.**  
The antipsoriatic agent dimethylfumarate immunomodulates T-cell cytokine secretion and inhibits cytokines of the psoriatic cytokine network  
*Br J Dermatol* 139(3): 390 – 5, 1998
- 136. O'Connell, J. R., Weeks, D. E.**  
Ped check: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis  
*Am J Hum Genet* 64: 259 – 266, 1998
- 137. O'Connell, P. G., Gerber, L. H., Digiovanna, J. J., Peck G. L.**  
Arthritis in patients with psoriasis treated with gamma-interferon  
*J Rheumatol* 19(1): 80 – 82, 1992
- 138. Oka, A., Tamiya, G., Tomizawa, M., Ota, M., Katsuyama, Y., Makino, S., et al.**  
Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the *HLA-C* gene  
*Hum Mol Genet* 8: 2165 – 70, 1999
- 139. Okanoue, T., Itoh, Y., Yasui, K.**  
Autoimmune disorders in interferon therapy  
*Nippon Rinsho* 52(7): 1924 – 8, 1994
- 140. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), John Hopkins University**  
Psoriasis susceptibility 1; PSORS1 (\*177900), McKusick, V. A., et al., 25.07.2000  
Psoriasis susceptibility 2; PSORS2 (\*602723), Wilson, H. Y. L., et al., 28.08.2000  
Psoriasis susceptibility 3; PSORS3 (\*601454), Wilson, H. Y. L., et al., 01.07.1999  
Psoriasis susceptibility 4; PSORS4 (\*603935), McKusick, V. A., et al., 28.12.1999  
Psoriasis susceptibility 5; PSORS5 (\*604316), McKusick, V. A., et al., 29.11.1999  
Psoriasis susceptibility 6; PSORS6 (\*605364), McKusick, V. A., et al., 25.10.2000  
Corneodesmosin; CDSN (\*602593), McKusick, V. A., et al., 01.06.1999  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 141. Ortonne, J.-P.**  
Redent development in the understanding of the pathogenesis of psoriasis  
*Brit J Dermatol* 140 (Suppl. 54): 1 – 7, 1999
- 142. Ott, J.**  
Statistical properties of the haplotype relative risk  
*Genet Epidemiol* 6: 127 – 130, 1989



- 143. Parsian, A., Todd, R. D., Devor, E. J., et al.**  
Alcoholism and alleles of the human D2 dopamine receptor locus  
*Arch Gen Psychiatry* 48: 655 – 663, 1991
- 144. Paterson, A. D., Naimark, D. M., Petronis, A.**  
The analysis of parental origin of alleles may detect susceptibility loci for complex disorders  
*Hum Hered* 49(4): 197 – 204, 1999
- 145. Paukkonen, K., Naukkarinen, A., Horsmanheimo, M.**  
The development of manifest psoriatic lesions is linked with the appearance of ICAM-1 positivity on keratinocytes  
*Arch Dermatol Res*: 287(2): 165 – 70, 1995
- 146. Plunkett, A., Marks, R.**  
A review of the epidemiology of psoriasis vulgaris in the community  
*Austral J Dermatol* 39: 225 – 232, 1998
- 147. Poikolainen, K., Reunala, T., Karvonen, J.**  
Smoking, alcohol and life events related to psoriasis among women  
*Brit J Dermatol* 130: 473 – 477, 1994
- 148. Quintana-Murci, L., Semino, O., Bandelt, H. J., Passarino, G., McElreavey, K., Santachiara-Benerecetti, A. S.**  
Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens from Africa through eastern Africa  
*Nat Genet* 23(4): 437 – 41, 1999
- 149. Rahman, P., Gladman, D. D., Schentag, C. T., Petronis, A.**  
Excessive paternal transmission in psoriatic arthritis  
*Arthritis Rheum* 42(6): 1228 – 31, 1999
- 150. Ramoz, N., Rueda, L. A., Bouadjar, B., Favre, M., Orth, G.**  
A susceptibility locus for epidermodysplasia verruciformis, an abnormal predisposition to infection with the genic human papillomavirus type 5, maps to chromosome 17qter in a region containing a psoriasis locus  
*J Invest Dermatol* 112(3): 259 – 63, 1999
- 151. Reik, W., Brown, K. W., Schneid, H., et al.**  
Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by an altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain  
*Hum Mol Genet* 4, No. 12: 2379 – 2385, 1995
- 152. Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhart, A. H., et al.**  
Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci  
*Am J Hum Genet* 66: 1863 – 1870, 2000
- 153. Romanus**  
Psoriasis from a prognostic and hereditary point of view  
*Dissertation: Uppsala*, 1945

- 154. Rook, A., Wilkinson, D. S., Ebling, F. J. G., et al.**  
Textbook of Dermatology  
*Blackwell Scientific Publications, 4<sup>th</sup> ed., 1986*
- 155. Rothnagel, J. A., Dominey, A. M., Dempsey, L. D., Longley, M. A., et al.**  
Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis  
*Science 257(5073): 1128 – 30, 1992*
- 156. Rubinstein, P., Walker, M., Carpenter, C., et al.**  
Genetics of HLA disease associations. The use of the haplotyp relative risk (HRR) and the “haplo-delta” (Dh) estimates in juvenile diabetes from three racial groups  
*Human Immunology 3: 384, 1981*
- 157. Russel, T. J., Schultes, L. M., Kuban, D. J.**  
Histocompatibility (HLA) anitgens associated with psoriasis  
*N Engl J Med 287: 738 – 740, 1972*
- 158. Saiki, R. K., Faloona, F., Mullis, K. B., et al.**  
Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences und Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia  
*Science 230: 1350 – 1354, 1985*
- 159. Samuelsson, L., Enlund, F., Torinsson, A., Yhr, M., Inerot, A., Enerback, C., Wahlstrom, J., et al.**  
A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach  
*Hum Genet 105(6): 523 – 9, 1999*
- 160. Sapienza, C., Peterson, A. C., Rossant, J., Balling, R.**  
Degree of methylation of transgenes is dependent an gamete of origin  
*Nature 328: 251 – 254, 1987*
- 161. Schaid, D. J.**  
Transmission disequilibrium, family controls, and great expectations  
*Am J Hum Genet 63: 935 – 941, 1998*
- 162. Schiebler, T. H., Peiper, U., Schneider, F.**  
Histologie  
*Springer-Verl., Berlin, Heidelberg, New York, 1986*
- 163. Schmid-Ott, G., Jacobs, R., Jager, B., Klages, S., Wolf, J., Werfel, T., Kapp, A., Schurmeyer, T., et al.**  
Stress-induced endocrine and immunological changes in psoriasis patients and healthy controls. A preliminary study  
*Psychother Psychosom 67(1): 37 – 42, 1998*

- 164. Schmitt-Egenolf, M., Eiermann, T. H., Boehncke, W.-H., Stander, M., Sterry, W.**  
Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) Class I side of the extended haplotype Cw6-B57-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0303: a population- and family-based study  
*J Invest Dermatol* 106: 711 – 714, 1996
- 165. Schöpf, E., Augustin, M.**  
Therapie der Psoriasis mit Fumarsäure-Estern  
*Deutsches Ärzteblatt* 93(48): B 2482 – B 2483, 1996
- 166. Serre, G., Mils, V., Haftek, M., Vincent, C., Croute, F., et al.**  
Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope  
*J Invest Dermatol* 97(6): 1061 – 72, 1991
- 167. Shiina, T., Tamiya, G., Oka, A., Takishima, N., et al.**  
Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region  
*Proc Natl Acad Sci USA* 96, No. 23: 13282 – 13287, 1999
- 168. Sigmundsdottir, H., Sigurgeirsson, B., Troye-Blomberg, M., Good, M. F., Valdimarsson, H., et al.**  
Circulating T cells of patients with active psoriasis respond to streptococcal M-peptides sharing sequences with human epidermal keratins  
*Scand J Immunol* 45(6): 688 – 97, 1997
- 169. Simon, M., Montezin, M., Guerrin, M., Durieux, J. J., Serre, G.**  
Characterization and purification of human corneodesmosin, an epidermal basic glycoprotein associated with corneocyte-specific modified desmosomes  
*J Biol Chem* 272(50): 31770 – 31776, 1997
- 170. Skov, L., Chan, L. S., Fox, D. A., Larson, J. K., Voorhees, J. J., Cooper, K. D., et al.**  
Lesional psoriatic T cells contain the capacity to induce a T cell activation molecule CDw60 on normal keratinocytes  
*Am J Pathol* 150(2): 675 – 83, 1997
- 171. Solter, D.**  
Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes  
*Ann Rev Genet* 22: 127 – 146, 1988
- 172. Spielman, R. S., McGinnis, R. E., Ewens, W. J.**  
Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)  
*Am J Hum Genet* 52: 506 – 516, 1993
- 173. Spielman, R. S., Ewens, W. J.**  
The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association  
*Am J Hum Genet* 59: 983 – 989, 1996

- 174. Springer, T. A.**  
Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm  
*Cell* 76: 301 – 314, 1994
- 175. Strauch, K., Fimmers, R., Kurz, T., Deichmann, K. A., Wienker, T. F., Baur, M. P.**  
Parametric and nonparametric multipoint linkage analysis with imprinting and two-locus-trait models: application to mite sensitization  
*Am J Hum Genet* 66: 1945 – 1957, 2000
- 176. Strachan, T., and Read, A. P.**  
Kap. 12: Die genetische Kartierung  
Kap. 13: Das Human Genome Project  
Kap. 14: Die Identifizierung von menschlichen Krankheitsgenen  
Kap. 18: Komplexe Krankheiten  
In: Molekulare Humangenetik  
*Spektrum Akad Verlag*, 1996
- 177. Stryer, L.**  
Biochemie, S. 121 – 124  
*Spektrum Akad Verlag, Heidelberg, Berlin, NY*, 1991
- 178. Surani, M. A. H.**  
Evidence and consequences of differences between maternal and paternal genomes during embryogenesis in the mouse  
In: Rossan, J., Pederson, R. A. (eds)  
*Cambridge University Press, Cambridge*: 401 – 435, 1986
- 179. Swanbeck, G., Inerot, A., Martinsson, T., Wahlström, J.**  
A population genetic study of psoriasis  
*Brit J Dermatol* 131: 32 – 39, 1994
- 180. Swanbeck, G., Inerot, A., Martinsson, T., Wahlström, J., Enerback, C., et al.**  
Age of onset and different types of psoriasis  
*Brit J Dermatol* 133(5): 768 – 773, 1995
- 181. Swanbeck, G., Inerot, A., Martinsson, T., Wahlström, J., Enerback, C., et al.**  
Genetic counselling in psoriasis: empirical data on psoriasis among first-degree relatives of 3095 psoriatic probands  
*Brit J Dermatol* 137(6): 939 – 942, 1997
- 182. Svejgaard, A., Staub-Nielson, L., Svejgaard, E., Kissmeyer-Nielson, F., et al.**  
HLA in psoriasis vulgaris and pustular psoriasis – population and family studies  
*Brit J Dermatol* 91: 145 – 153, 1974
- 183. Tazi-Ahnini, R., Camp, N. J., Cork, M. J.**  
Novel genetic association between the corneodesmosin (*MHC S*) gene and susceptibility to psoriasis  
*Hum Mol Genet* 8(6): 1135 – 1140, 1999

- 184. Tazi-Ahnini, R., di Giovine, F. S., Cox, A., Keohane, S. G., Cork, M. J.**  
Corneodesmosin (MHC S) gene in guttate psoriasis  
*Lancet* 354: 597 (correspondence), 1999
- 185. Tay, G. K., Hui, J., Gaudieri, S., Schmitt-Egenolf, M., Martinez, O. P., et al.**  
PERB11 (MIC): a polymorphic MHC gene is expressed in skin and single nucleotide polymorphisms are associated with psoriasis  
*Clinical and Experimental Immunology* 119: 553 – 558, 2000
- 186. Teraoka, Y., Naruse, T. K., Oka, A., Matsuzawa, Y., Shiina, T., et al.**  
Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SC1 telomeric of the HLA-C gene and lack of association of psoriasis vulgaris  
*Tissue Antigens* 55: 206 – 211, 2000
- 187. Terwilliger, J. D., und Weiss, K. M.**  
Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality?  
*Current Opinion in Biotechnology* 9: 578 – 594, 1998
- 188. Terwilliger, J. D., Zollner, S., Laan, M., Paabo, S.**  
Mapping genes through the use of linkage disequilibrium generated by genetic drift: „drift mapping“ in small populations with no demographic expansion  
*Hum Hered* 48(3): 138 – 154, 1998
- 189. Thomson, G.**  
Mapping disease genes: family-based association studies  
*Am J Hum Genet* 57: 487 – 498, 1995
- 190. Tiilikainen, A., Lassus, A., Karvonen, J., Vartiainen, P., Julin, M.**  
Psoriasis and HLA-Cw6  
*Brit J Dermatol* 102: 179 – 184, 1980
- 191. Tomfohrde, J., Silverman, A., Barnes, R., Fernandez-Viona, M.-A., et al.**  
Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q  
*Science* 264: 1141 – 1145, 1994
- 192. Traupe, H., van Gulp, P. J. M., Happle, R., Boezeman, J., van de Kerkhof, P. C. M., et al.**  
Psoriasis vulgaris, fetal growth, and genomic imprinting  
*Am J Hum Genet* 42: 649 – 654, 1992
- 193. Mrowietz, U.**  
Psoriasis  
In: Traupe, H., Hamm, H.  
Pädiatrische Dermatologie  
*Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1999*
- 194. Trampisch, H. J., Windeler, J., Ehle, B., Lange, S.**  
Vergleich von Gruppen – Kategoriale Zielgröße  
In: Medizinische Statistik  
*Springer Verlag, Berlin, 1997*

- 195. Trembath, R. C., Clough, R. L., Rosbotham, J. L., et al.**  
Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis  
*Hum Mol Genet* 6(5): 813 – 820, 1997
- 196. Underhill, P. A., Shen, P., Lin, A. A., Jin, L., Passarino, G., Yang, W. H., Kauffman, E., et al.**  
Y chromosome sequence variation and the history of human populations  
*Nat Genetic* 26: 358 – 361, 2000
- 197. Valdimarsson, H., Baker, B. S., Jónsdóttir, I, Fry, L.**  
Psoriasis: a disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes  
*Immunology Today* 7(9), 256 – 8, 1986
- 198. Valdimarsson, H., Baker, B. S., Jónsdóttir, I, Powels, A., Fry, L.**  
Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens?  
*Immunology Today* 16(3), 145 – 149, 1995
- 199. Valdimarsson, H., Sigmundsdottir, H., Jónsdóttir, I**  
Is psoriasis induced by streptococcal superantigens and maintained by M-protein-specific T cells that cross-react with keratin?  
*Clin Exp Immunol* 107: Suppl 1: 21 – 4, 1997
- 200. Van de Kerkhof, P. C. M., Van Erp, P. E. J.**  
The Role of Epidermal Proliferation in the Pathogenesis of Psoriasis  
*Skin Pharmacol* 9: 343 – 354, 1996
- 201. Van der Mey, A. G. L., Maaswinkel-Mooy, P. D., Cornellisse, C. J., et al.**  
Genomic imprinting in hereditary glomus tumours: evidence for new genetic theory  
*Lancet* 2: 1291 – 1294, Dec. 1989
- 202. Veal, C.D., Capon, F., Allen, M.H., Trembath, R.C., et al.**  
Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis-susceptibility locus  
*Am J Hum Genet* 71: 554 – 564, 2002
- 203. Vicanova, J., Mommaas, A. M., Mulder, A. A., Koerten, H. K., Ponc, M.**  
Impaired desquamation in the in vitro reconstructed human epidermis  
*Cell Tissue Res* 286(1): 115 – 22, 1996
- 204. Ward, J. M., Barnes, R. M. R.**  
HLA antigens in persistent palmoplantar pustulosis and its relationship to psoriasis  
*Brit J Dermatol* 99: 477 – 483, 1978
- 205. Watson, W., Cann, H. W., Farber, E. M., Nall, M. L.**  
The genetics of psoriasis  
*Arch Derm* 105: 197 – 207, 1972
- 206. Weeks, D. E., and Lange, K.**  
The Affected-Pedigree-Member Method of Linkage Analysis  
*Am J Hum Genet* 42: 315 - 326, 1988

- 207. Weinstein, G. D.**  
Epidermal cell kinetics  
In: Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K.  
*Dermatology in General Medicine, 3. Aufl., NY, 1987*
- 208. Whyte, H. J., Baughman, R., D.**  
Acute Guttate Psoriasis and Streptococcal Infection  
*Arch Dermatol 89: 350 – 356, 1964*
- 209. Wilson, S. R.**  
On extending the transmission/disequilibrium test (TDT)  
*Ann Hum Genet 61: 151 – 161, 1997*
- 210. Wilson, C. L., Dean, D., Lane, E. B., Dawber, R. P., Leigh, I. M.**  
Keratinocytes differentiation in psoriatic scalp: morphology and expression of epithelial keratins  
*Brit J Dermatol 131(2): 191 – 200, 1994*
- 211. Wolfer, L. U., Djemadje-Oudjiel, N., Hiletework, M, et al.**  
HIV-associated psoriasis. Clinical and histological observations in 36 patients  
*Hautarzt 49(3): 197 – 202, 1998*
- 212. Wrone-Smith, T., Nickoloff, B. J.**  
Dermal injection of immunocytes induces psoriasis  
*J Clin Invest 98(8): 1878 – 87, 1996*
- 213. Wrone-Smith, T., Mitra, R. S., Thompson, C. B., Jasty, R., Castle, V. P., Nickoloff, B. J.**  
Keratinocytes derived from psoriatic plaque are resistant to apoptosis compared with normal skin  
*Am J Pathol 151(5): 1321 – 9, 1997*
- 214. Quintana-Murci, L., et al.**  
Genetic evidence of an early exit of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa  
*Nature Genet 23: 437 – 441, 1999*
- 215. Zachos, G., Koumantaki, E., Varelzidis, A., Spandidos, D. A.**  
Evidence for loss of heterozygosity in human psoriatic lesions  
*British J Dermatol 139: 974 – 977, 1998*
- 216. Zheng, G. J., Thomson, G., Pen, Y. N.**  
Allelic instability in mitosis can explain “genomic imprinting” and other genetic phenomena in psoriasis  
*Am J Med Genet 51(2): 163 – 4, 1994*
- 217. Zhou, Y., Chaplin, D. D.**  
Identification in the HLA class I region of a gene expressed late in keratinocyte differentiation  
*Proc Natl Acad Sci USA 90: 9470 – 9474, 1993*

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb.:	Seite
1.1.	Liganden-Rezeptor-Beziehungen zwischen APZ und CD8+ Zelle - 23 -
1.2.	Wege der Aktivierung von NK-T-Zellen - 25 -
1.3.	Übersicht zum MHC - 34 -
2.1.	Stammbaum eines Falk-Rubinstein-Trios - 46 -
2.2.	Triokonstellationen des TDT und RC-TDT - 48 -
2.3.	Schematische Darstellung der PCR - 53 -
2.4.	Schema zur Laser-Scanning-Technologie des Kapillarsequenzierers - 55 -
2.5.	Schema der SNP-Analyse - 57 -
2.6.	Agarose-Bild von genomischer DNA - 59 -
2.7.	Thermozykler-Programmierung - 60 -
2.8.	Darstellung des „MegaBace™“ - 63 -
2.9.	Ausschnitt aus dem Corneodesmosin-Gen mit Darstellung der <i>Hph1</i> - Schnittprodukte - 65 -
2.10.	Information zu <i>Hph1</i> - 66 -
2.11.	Agarosebild einer Elektrophorese von <i>Hph1</i> -Inkubationsprodukten - 67 -
2.12.	Pedfile-Datei - 68 -
3.1.	Verhältnis von betroffenen Männern zu betroffenen Frauen - 71 -
3.2.	Herkunft der Familien - 72 -
3.3.	Verteilung der Allele von CDSN*1243 - 74 -
3.4.	Verhältnis von männlichen zu weiblichen Indexpersonen und paternalen zu maternalen Trios - 77 -
4.1.	Schematische Darstellung zum phylogenetischen Verständnis unterschiedlicher Haplotypen - 92 -
4.2.	Idealisierte Stammbäume eines maternalen und paternalen Imprintings - 95 -



## 7. Tabellenverzeichnis

<i>Tab.:</i>		<i>Seite</i>
1.1.	Übersicht Hautphänomene der Psoriasis	- 2 -
1.2.	Übersicht Beschreibungen eines paternalen Effekts	- 30 -
1.3.	Typisierung der Psoriasis	- 32 -
1.4.	OMIM: PSORS1 – PSORS6	- 32 -
1.5.	MHC-Gene 81 bis 120	- 43 -
2.1.	Kombinationen der Alleltransmissionen beim TDT	- 47 -
2.2.	Eigenschaften und Primer des Mikrosatelliten tn62	- 60 -
2.3.	PCR-Ansatz und Mastermix für tn62	- 61 -
2.4.	PCR-Ansatz für CDSN*1243	- 61 -
2.5.	Oligonukleotid-Primer von CDSN*1243	- 62 -
2.6.	Hph1-Inkubationsansatz	- 66 -
3.1.	Zusammensetzung und Größe des Datensatzes	- 70 -
3.2.	Häufigkeit der Psoriasis vulgaris in der Studiengruppe	- 71 -
3.3.	Häufigkeiten der Triokonstellationen	- 72 -
3.4.	Genotypisierungsrate der Marker	- 73 -
3.5.	Übersicht der Basen, Aminosäuren und Allele von CDSN*1243	- 73 -
3.6.	TDT-Ergebnisse von CDSN*1243 und tn62	- 76 -
3.7.	Vergleich der <i>p</i> -Werte der Marker	- 76 -
3.8.	Maternale versus paternale Vererbung bei Söhnen und Töchtern	- 78 -
3.9.	Maternale versus paternale Transmission von Allel 2 bei CDSN*1243	- 79 -
3.10.	Maternale versus paternale Transmission von Allel 4 bei tn62	- 80 -
3.11.	Transmission von Allel 2 (CDSN*1243) auf Söhne und auf Töchter	- 82 -
3.12.	Transmission von Allel 4 (tn62) auf Söhne und auf Töchter	- 82 -

## Anhang

### A.1. Übersicht zur Therapie der Psoriasis vulgaris (s. Kap. 1.1.2.)

<p><u>Lokal zur Entschuppung</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Salicylsäure</i> (cave Kinder: Resorption und Nierentoxizität) Öl-/Solebäder</li> <li>• Ölhauben</li> </ul>	<p><u>Systemisch</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Retinoide: Acitretin</i> (teratogen) (+) Gut in Kombination mit: PUVA, UV-B, Vit-D<sub>3</sub>-Analoge lokal</li> <li>• <i>Methotrexat</i> (Leukopenie, Lebertoxizität)</li> <li>• <i>Cyclosporin A</i> (Nierentoxizität)</li> <li>• <i>Fumarsäure</i> (Magen/Darmbeschwerden, Hitzegefühl u.a.)</li> <li>• Cortison wird <u>nicht</u> empfohlen (!) (starker Reboundeffekt)</li> <li>• <b>Neu:</b> <i>Biologicals (Alefcept, Efalizumab, Etanercept, Infliximab, u. a.)</i></li> </ul>
<p><u>Lokal antipsoriatisch</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Dithranol</i> (Irritation gesunder Hautstellen, Verfärbung)</li> <li>• <i>Kortikosteroide</i> (Rezidivneigung)</li> <li>• <i>Vitamin-D<sub>3</sub>-Präparate</i> (milde Irritation, Resorption) (+) Gut mit Cortison und UV-B lokal</li> <li>• <i>Teerpräparate</i> (Photosensibilisierung) (+) In Kortisonsalbenmischungen</li> <li>• <i>UV-B-Phototherapie</i> (Langwierig und aufwendig) (+) Gute Kombinierbarkeit mit Retinoiden und Lokaltherapie</li> <li>• <i>Orale/lokale Photochemotherapie</i> - “PUVA”/”Bade-PUVA” (wie UV-B, jedoch wirksamer)</li> </ul>	

Die derzeit wichtigsten medikamentösen und physikalischen Behandlungsmöglichkeiten der Psoriasis vulgaris. Wesentliche Nebenwirkungen sind in Klammern gesetzt; (+) gibt Hinweise auf eine Kombinationstherapie.

# PATIENTEN INFORMATION

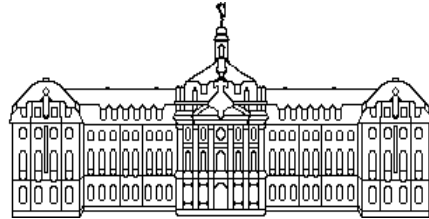
*Psoriasis-Projekt Münster*

**Leitung: Prof. Dr. med. H. Traupe**

**Westfälische Wilhelms-Universität Münster**

**Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten**

-Allgemeine Dermatologie und Venerologie-  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med.T. Luger



## Multicenter-Studie zur Genetik der Schuppenflechte

**Sehr geehrte Patientin!  
Sehr geehrter Patient!**

Die Universitätshautkliniken Münster und der Charité Berlin beschäftigen sich gemeinsam mit der Erforschung der erblichen Faktoren, die bei der Schuppenflechte eine Rolle spielen.

Um Patienten mit Schuppenflechte in Zukunft besser helfen zu können, möchten wir durch Blutuntersuchungen mehr über die Ursachen der Vererbung erfahren. Dabei sind wir auf Ihre Mithilfe angewiesen!

Unterstützt durch die Hautfachärzte in Münster und Umgebung haben wir schon bei vielen Mitgliedern von Familien mit Schuppenflechte Blutuntersuchungen durchführen können. Erste Ergebnisse zu erblichen Faktoren liegen bereits vor. Wir würden uns sehr freuen, wenn weitere Familien, bei denen die Schuppenflechte gehäuft vorkommt, nämlich bei wenigstens 2 Familienmitgliedern, sich an den Untersuchungen beteiligen würden, z.B. durch eine einmalige Blutprobe. Dies könnte im Rahmen eines Hausbesuches geschehen, oder hier in der Praxis Ihres Hautarztes.

Wenn Sie an einer Mitarbeit interessiert sind, bitten wir Sie, **beiliegende Postkarte** auszufüllen, zu frankieren und an uns abzuschicken oder hier in der Praxis abzugeben! Rückfragen mgl. bei Fr. Stadelmann, Ärztin unter 0251/83-56525 od. über die Pforte unter 0251/83-56501 Mo/Di/Fr

**Wir bedanken uns im voraus und verbleiben mit freundlichen Grüßen**

Prof. Dr. med. H. Traupe

V. Hoppe, cand. med.

A. Brinkmann, Ärztin i.P.

A.3 Dokumentation des benutzten Einverständnis- und Fragebogens  
(s. Kap. 2.4.)

Dieser Einverständnis- und Fragebogen wurde bei den Hausbesuchen mit jedem Familienmitglied einzeln ausgefüllt. Die Informationsseite konnte - meistens noch mit unseren Adressen versehen - behalten werden.

---

# Psoriasis-Projekt Münster

Leitung: Prof. Dr. med. H. Traupe

## Multicenter-Studie zur Genetik der Schuppenflechte

### **Information für Familienangehörige und Einverständniserklärung**

Sehr geehrte Patientin! Sehr geehrter Patient!

Sehr geehrte Familienangehörige!

Liebes Kind!

Die Schuppenflechte ist eine oft über viele Jahre hinweg verlaufende entzündliche Hauterkrankung. An dem Auftreten der Erkrankung sind sowohl Erbfaktoren als auch Umweltfaktoren beteiligt.

Unsere Klinik, die Universität Berlin und die Fachklinik Bad Bentheim beschäftigen sich gemeinsam mit der Erforschung der erblichen Faktoren, die bei der Psoriasis eine Rolle spielen. Da diese Vererbung sehr komplex ist, interessieren wir uns für Familien, wie Ihre Familie, bei der die Schuppenflechte gehäuft auftritt, um neue Erkenntnisse zu gewinnen.

Vererbt wird bei der Schuppenflechte nicht die Erkrankung, sondern die Anlagebereitschaft. Diese beruht wahrscheinlich auf dem Zusammenspiel mehrerer Gene. Um in Zukunft Patienten mit Schuppenflechte besser helfen zu können, möchten wir über diese Anlagebereitschaft mehr erfahren. Ziel ist es im Rahmen unserer wissenschaftlichen Untersuchungen die Gene, die zur genetischen Disposition für die Psoriasis beitragen aufzudecken und später zu isolieren.

Zur Durchführung dieser Untersuchungen sind wir auf Familien angewiesen, bei denen die Schuppenflechte gehäuft vorkommt. Deshalb haben wir uns an Sie gewandt!

Wir möchten dazu in Ihrer Familie sowohl bei den von der Psoriasis unmittelbar betroffenen, als auch bei den nicht an der Erkrankung leidenden Familienangehörigen etwas Blut (ca. 30 ml) für genetische Untersuchungen

abnehmen, und wir möchten diese Familienangehörigen von einem Arzt noch einmal auf das Vorliegen einer Psoriasis vulgaris untersuchen.

### **Ablauf der Studie:**

Sowohl Blutentnahme als auch klinische Untersuchung wird in der Regel im Rahmen eines Familienbesuchs bei einem Angehörigen Ihrer Familie zuhause, vor Ort, durchgeführt. Zu diesem Besuch kommt ein Arzt zu Ihnen nach Hause, an den Sie dann auch noch spezielle Fragen richten können.

### **Risiken und Nebenwirkungen**

Im Rahmen der Blutentnahme kann es gelegentlich zu einem Bluterguß kommen. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß auch bei nicht an Psoriasis erkrankten Personen aufgrund der Laboruntersuchungen Hinweise für die Anlagebereitschaft für die Psoriasis gefunden werden. Sie haben deshalb die Möglichkeit, von vornherein anzukreuzen, daß Sie über etwaige Ergebnisse nicht informiert werden möchten.

### **Datenschutz**

Sämtliche persönlichen Daten, die im Rahmen der Behandlung notwendigerweise aufgezeichnet werden, werden vertraulich behandelt und werden nicht an Dritte weitergegeben.

### **Allgemeines**

Die Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Studie ist freiwillig. Auch wenn Sie daran nicht teilnehmen möchten, entstehen Ihnen dadurch keine Nachteile.

Mit Ihrer Unterschrift bestätigen Sie ausdrücklich, daß Sie die Möglichkeit hatten, Fragen zu stellen und daß Sie mit der Weitergabe der Sie betreffenden Daten an die unmittelbar an diesem wissenschaftlichen Vorhaben beteiligten Wissenschaftlern einverstanden sind. Außerdem bestätigen Sie, daß Sie diese schriftliche Information erhalten und verstanden haben.

### **Bitte kreuzen Sie an:**

1. Ich bin damit einverstanden, daß mich betreffende wissenschaftliche Ergebnisse eventuell anderen Familienangehörigen mitgeteilt werden.

**JA**                       **Nein**

2. Ich möchte über mich betreffende Ergebnisse generell informiert werden.

**JA**                       **Nein**

Name: \_\_\_\_\_

Vorname: \_\_\_\_\_

Geb. am: \_\_\_\_\_

Alter bei Beginn der Psoriasis: \_\_\_\_\_

Straße: \_\_\_\_\_

Ort: \_\_\_\_\_

Telefonnr.: \_\_\_\_\_

**Datum:** \_\_\_\_\_

**Unterschrift:** \_\_\_\_\_



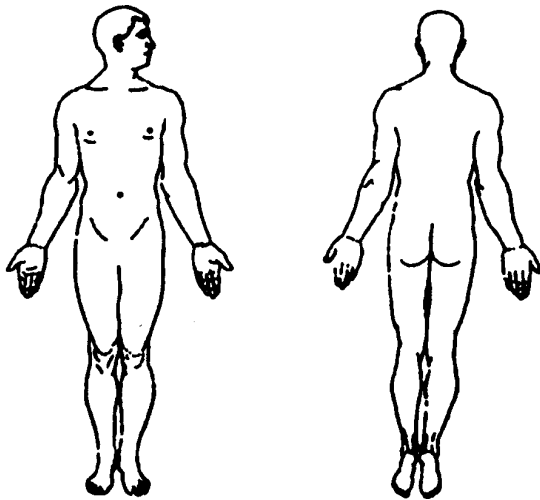
**Psoriasis**

**Orientierender Status**

Erythem, Infiltrat, Schuppung: 0= nicht vorhanden, 1= milde, 2= moderat, 3= schwer, 4= sehr schwer.

**PASI-Score:**

Multiplikationsfaktor	Betroffene Oberfläche 1-6	Erythem 0-4	Infiltrat 0-4	Schuppen 0-4
0,1 Kopf				
0,2 Rumpf				
0,3 obere Extremität				
0,4 untere Extremität				



Fingernägel:	rechts					links				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Tüpfelchen	/	/	/	/	//	/	/	/	/	/
Hyperkeratosen	/	/	/	/	//	/	/	/	/	/
Nageldystrophie	/	/	/	/	//	/	/	/	/	/

## Psoriasis Orientierender Status

Erythem: 0-4  
Schuppung: 0-4  
Skalierung der Oberfläche:

1= kleiner 10%  
2= 10-30%  
3= 30-50%  
4= 50-70%  
5= 70-90%  
6= 90-100%

Kopf	Oberfläche:	Erythem:	Schuppung:
• Stirnhaargrenze	-----	-----	-----
• Kopfhaut	-----	-----	-----
• Okzipitalregion	-----	-----	-----
• Retroaurikulär	-----	-----	-----
• Gesicht	-----	-----	-----
• Ellenbogen/Arme	-----	-----	-----
• Bauch/Sakralregion	-----	-----	-----
• Knie/Beine	-----	-----	-----

## Stammbaum

(An dieser Stelle wurden bei komplexeren Verhältnissen die Verwandtschaftsbeziehungen in einer Skizze festgehalten.)

---



#### A.4. DNA-Extraktions-Protokoll (s. Kap. 2.6.1.)

- 1. Lyse der Erythrozyten:**
  - *EDTA-Blut + 4 x Volumen der **Lösung A***  
(im 50 ml Falcon-Röhrchen)
  - 4 min stehen lassen und zwischendurch mehrmal kräftig schütteln
  - 5 min bei 1.300 g zentrifugieren (2.500 rpm in Megafuge 2.0 mit Rotor 8155)
  - Überstand vorsichtig dekantieren und Röhrchen für kurze Zeit über Kopf auf ein Papierhandtuch stellen
- 2. Zell-Lysis:**
  - *Zellpellet + 2 ml **Lösung B***
  - Resuspendieren mit dem Vortexgerät
  - Wenn das Pellet gleichmäßig gelöst ist, die Lösung in ein 15-ml-Röhrchen überführen (1.000 µl Pipette)
- 3. Deproteinisation:**
  - *dazu 500 µl **Lösung C** geben*
  - per Hand 10 – 15 mal über Kopf mischen
- 4. Extraktion:**
  - *dazu **kaltes Chloroform** (- 4 °C) geben*
  - per Hand 10 – 15 mal über Kopf mischen
  - 5 min bei 1.300 g zentrifugieren (2.500 rpm in Megafuge 2.0 R mit Rotor 8155)
    - *den Überstand **ohne Interphase** vorsichtig abpipettieren*
  - mit Pipetten von größeren Volumina zu Kleineren wechseln
  - ggf. die Deproteinisation und den Chloroform-Schritt wiederholen
    - *dazu 1 x Volumen eiskaltes **Isopropanol** (- 20 °C) geben und präzipitierenden*
    - *DNA-Faden mit einem Glasstäbchen aufnehmen und in ein 1,5-ml-Eppi mit 1 ml kaltem **70 % Ethanol** ( 4 °C) überführen*
  - für 15 min bei 4 °C mit 14.000 rpm zentrifugieren
  - evtl. nochmals mit 70 % Ethanol waschen und 10 min zentrifugieren
- 5. Alkohol-Entfernung und Präparation der *Stock-DNA*:**
  - *Ethanol sorgfältig entfernen und das Pellet im geöffneten Eppi bei 37 °C für 5 – 10 min **trocknen***
  - *dazu 450 µl **dH<sub>2</sub>O** geben und 24 h lösen lassen*
  - *dazu 50 µl **TE 10-fach** pipettieren*
  - Aufbewahrung der *Stock-DNA* (0,5 ml 1-fach TE bei pH 8,0) bei – 20°

### **DNA-Extraktionslösungen:**

Lösung A: 10 mM TrisHCl, 320 mM Succhrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton X 100

Lösung B: 400 mM TrisHCl, 60 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 % SPS

Lösung C: 5 M Na-Perchlorat (100 g) → auf 142 ml mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

### **A5. Dokumentation der im Labor benutzten Utensilien**

#### **Geräte:**

Auftragsplatten:	Bear Coded Microseal 96 well Plate – Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Autoclav:	Wolf Autoklaviergerät
Automatik-Pipetten:	<i>edp</i> Rapid Charger / 250 µl – Rainin, USA Eppendorf <i>EDOS</i> 5221 – Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Elektrophorese-Kammer:	40er Horizon® 11·14 & 16er Horizon® 58 – Life Technologies, Gibco BRL Horizontal Gel Elektrophoresis Apparatus
Eppendorf-Reaktionsgefäße:	1,5 & 2 ml Eppendorf – Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Magnetrührer:	RCT basic - IKA Labortechnik
Kapillarsequenziergerät:	Mega Base 1000, DNA Analysis System - Amersham Pharmazia Biotech Europe GmbH, Freiburg & Molecular Dynamics Inc., Californien, USA
Mikrotiter-Pipetten:	2 –10 – 200 – 1000 – 5000 µl – Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Mikrotiter-Platten:	Microtiterplatten 96 Wells – Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
Mikrowelle:	R 2V16 700 Watt – Sharp
Mutterplatten:	Deep well blocks – Matrix Technologies
Netzgerät:	Elektrophoresis Power Supply EPS 200 - Pharmacia Biotech,Uppsala, Schweden
PCR-Gerät:	DNA Engine Tetrad / PTC 225 Peltier Thermal Cycler – MJ Research, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
Photodokumentationssystem:	MidiDoc(TM) / Mitsubishi Video Copy Processor– Herolab Molekulare Trenntechnik, Wiesloch
Pipettierroboter:	Genesis RSP 150 – Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

	Pipettiersystem Cybi(TM)-Well – CyBio AG, Jena
Thermoblock:	Thermomixer 5436 - Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Falc Thermoblock / eliwell EWT Q 905 – Renner GmbH, Darmstadt
Verdünnungsplatten:	U-Form PS-Microplatten 96 K – Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Vortexgerät:	MS 1 Minishaker – IKA Labortechnik,
Waage:	BP 3100S – Sartorius
Zentrifugen:	Megafuge 2.0 R – Heraeus Instruments GmbH, Berlin Biofuge fresco – Heraeus Instruments GmbH, Berlin

#### **Chemikalien, Enzyme und DNA-Marker:**

Agarose, ultra rein:	Gibco, Paisley, Scotland
Borsäure:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bromphenolblau-Natrium:	Merck, Darmstadt
Chloroform:	Merck, Darmstadt
dNTP:	Quantum Appligene, Berlin
dNTP-Puffer:	Quantum Appligene, Berlin
EDTA:	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Formamid:	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure:	Merck, Darmstadt
Ethanol:	Hausabfüllung MDC
Ethidiumbromid:	Merck, Darmstadt
Harnstoff:	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Isopropanol:	Merck, Darmstadt
LPA-Puffer:	10fach, Amersham Pharmazia
Magnesiumsulfat:	Merck, Darmstadt
Mega-Base-Matrix:	Long Read Matrix, Amersham Pharmazia, Freiburg
Mega-Base-Standart:	ET 400 R Size Standart, Amersham Pharmazia, Freiburg
Natriumacetat:	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid:	Merck, Darmstadt
Natriumperchlorat:	Merck, Darmstadt
Natronlauge:	Merck, Darmstadt
Primer:	BioTez, Berlin

Restriktionsenzym:	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Salzsäure:	Merck, Darmstadt
SL-Leiter:	Eurogentec, Köln
Succhrose:	Merck, Darmstadt
Taq-DNA-Polymerase:	5 U/ $\mu$ l, Invitac Berlin
TRIS, ultra rein:	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X 100:	Serva, Heidelberg

**Weitere Lösungen:**

10x TAE: 0,4 M Tris-Acetat; 10 mM EDTA; pH 8,0

10x TE: 0,1 M Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0

Stopmix: 0,25 % Orange G (Merck); 15 g 15% Ficoll 400 (Sigma); 10 mM EDTA

Alle Puffer und Lösungen wurden mit dH<sub>2</sub>O angesetzt und autoklaviert.

Alle Reagenzien entsprachen der Qualitätsstandart-Norm p. a..

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name: Vinzenz Oji, geb. Hoppe  
Anschrift: Kerkerinckstr. 20  
48151 Münster  
Telephon: 0049/(+0)251/2372774  
E-mail: ojiv@uni-muenster.de  
Geburtsdatum: 19.07.1974  
Geburtsort: Potsdam  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1981 bis 1985 Grundschule Babelsberg (Potsdam)  
1985 bis 1986 Gymnasium Altötting (Bayern)  
1986 bis 1994 Gymnasium Bielefeld (NRW)

### Ersatzdienst

1994 bis 1995 15-monatiger Zivildienst Franziskus-Hospital Bielefeld

### Hochschulbildung

WS 1995 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
15.09.1997 Ärztliche Vorprüfung  
18.09.1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1998/1999 Erasmus-Studienaustausch „Université du droit et de la Santé Lille“, Frankreich  
10.09.2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
26.09.2001 DAAD-Stipendium zur wissenschaftlichen Aus- und Fortbildung in Indien und Frankreich  
2001 bis 2002 Praktisches Jahr in Bangalore, Münster und Paris  
18.11.2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
01.01.2003 Beginn als AIP an der Universitätshautklinik Münster  
10.06.2003 Standesamtliche Hochzeit mit Melody Enyinna Oji  
14.12.2004 Geburt unseres Sohnes Alanna Nikolaus Oji

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meiner Familie und meinen Freunden/Freundinnen danken, die mich während der Doktorarbeitszeit so gut unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Heiko Traupe !

Viele weitere Personen haben mir bei dieser Arbeit geholfen: Dr. Anje Stadelmann, Dr. Peter Hensen, Dr. Hans-Christian Hennies, Prof. Dr. A. Reis, Fabienne Troitier, Wilfried Gunia, Dr. Christine Windemuth, Dr. Franz Rüschenndorf, Prof. Dr. Thomas Wienker, Mitarbeiterinnen der Dermatologischen Apparategemeinschaft Coerde, Dr. G. Papathanassiou, alle Patienten, die hinter unserer Arbeit stehen, u. v. m..