

ORIGINALES

Función efectora de linfocitos T CLA+ sobre queratinocitos autólogos en psoriasis*

M. Ferran^a, A.M. Giménez-Arnau^a, B. Bellosillo^b, R.M. Pujol^a y L.F. Santamaría-Babi^a

^aServicio de Dermatología. ^bServicio de Anatomía Patológica. Hospital del Mar-IMAS/IMIM. Barcelona. España.

Resumen. *Introducción.* Los linfocitos T CLA+ representan un subgrupo de linfocitos T de memoria con tropismo cutáneo que están implicados en diferentes enfermedades cutáneas mediadas por células T.

Material y métodos. Se estudió la expresión de algunos genes asociados a la psoriasis en queratinocitos de enfermos y sanos cultivados en diferentes condiciones, entre ellas la activación por sobrenadantes de linfocitos T CLA+ activados mediante anti-CD3/anti-CD28.

Resultados. Los queratinocitos psoriásicos activados por linfocitos CLA+ expresan más IP-10, HLA-DR, ICAM-1 e iNOS.

Discusión. Estos resultados sugieren que hemos establecido un modelo *in vitro* que permite estudiar la función efectora de los linfocitos T CLA+ sobre los queratinocitos en la psoriasis. Este modelo puede permitir la identificación de genes relevantes en la patogenia de la psoriasis al ser inducidos por linfocitos T CLA+.

Palabras clave: psoriasis, antígeno linfocitario cutáneo, CLA, queratinocito, iNOS.

EFFECTOR FUNCTION OF CLA+ T LYMPHOCYTES ON AUTOLOGOUS KERATINOCYTES IN PSORIASIS

Abstract. *Background.* Cutaneous lymphocyte antigen (CLA) is expressed by a subgroup of memory T cells that exhibit skin homing and are implicated in cutaneous T-cell-mediated diseases.

Material and methods. Expression of genes associated with psoriasis was analyzed in keratinocytes taken from patients and healthy individuals and cultured under different conditions, including activation using supernatants from CLA+ T lymphocytes activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies.

Results. Keratinocytes from psoriasis patients activated by CLA+ T lymphocytes expressed higher levels of interferon-inducible protein 10, HLA-DR, intercellular cell adhesion molecule 1, and inducible nitric oxide synthase.

Conclusions. Our results suggest that we have developed an *in vitro* model that will allow analysis of the effector role of CLA+ T lymphocytes on keratinocytes in psoriasis. This model may allow the identification of genes involved in the pathology of psoriasis through induction by CLA+ T lymphocytes.

Key words: psoriasis, cutaneous lymphocyte antigen, keratinocyte, inducible nitric oxide synthase.

Introducción

El antígeno leucocitario cutáneo (CLA) es un carbohidrato de membrana que se induce durante la activación del linfocito en el ganglio linfático, y que confiere a las células

que lo expresan un tropismo cutáneo y la capacidad de infiltrar la piel^{1,2}. Hasta la fecha, los linfocitos T CLA+ circulantes han sido implicados en la patogénesis de las inflamaciones cutáneas crónicas mediadas por células T como la dermatitis atópica, el eccema de contacto, el vitiligo y la dermatitis alérgica de contacto^{1,3}. En la psoriasis estos linfocitos T CLA+ con tropismo cutáneo presentan papeles patogénicos diferentes en las fases aguda y crónica de la enfermedad^{4,5}. En la fase aguda estarían implicados en el desencadenamiento de la lesión psoriásica a través de su interacción con las células dendríticas y los queratinocitos⁶. Recientemente hemos demostrado un mayor grado de activación de linfocitos T CLA+ circulantes, correlacionándose con el PASI y el BSA en las fases agudas de la psoriasis⁷. En las lesiones crónicas, las células T infiltrantes persistirían

*Financiación: Premio Fundación Salud 2000 para el estudio de la inmunología clínica de la psoriasis (2003).

Correspondencia:
Marta Ferran.
Servicio de Dermatología.
Hospital del Mar.
Passeig Marítim, 25-29.
08003 Barcelona.
mferran@imas.imim.es

Aceptado el 27 de febrero de 2008.

activadas y producirían mediadores que mantendrían el crecimiento y la diferenciación de los queratinocitos a través de mediadores derivados de las células dendríticas⁸.

Dado que los linfocitos T CLA+ constituyen la mayoría de los linfocitos T presentes en las placas psoriásicas⁹, el estudio de su interacción sobre células residentes como los queratinocitos puede aportar información sobre los mecanismos patológicos de la psoriasis. Aunque en los últimos años se ha podido caracterizar el perfil de expresión génica¹⁰ todavía no se ha estudiado la influencia que tienen los linfocitos T en la expresión génica de células relevantes como los queratinocitos. Este estudio ha desarrollado un modelo *in vitro* que permite determinar qué genes inducen los linfocitos T CLA+ activados en los queratinocitos psoriásicos del mismo individuo.

Material y métodos

Se estudiaron muestras de sangre periférica y biopsias cutáneas procedentes de tres pacientes adultos con psoriasis vulgar (excluyéndose explícitamente aquellos con eritema, psoriasis pustulosa o artritis asociada). A todos ellos se les practicó una extracción sanguínea para aislar las subpoblaciones linfocitarias CLA+ y CLA- y una biopsia cutánea en fresco para el cultivo celular y el estudio de la expresión génica.

A los pacientes incluidos en el estudio se les había practicado previamente una biopsia confirmatoria. Se valoró la gravedad (PASI), extensión (BSA) y se revisaron las características clínicas, incluyendo los posibles factores desencadenantes (infección estreptocócica, estrés, etc.). Las muestras se obtuvieron tras un período de blanqueo mínimo de 6 semanas sin ningún tipo de tratamiento. Asimismo, se incluyeron en el estudio dos controles sanos. Todos los pacientes y controles firmaron un consentimiento informado.

Purificación de linfocitos T CLA+ circulantes de sangre periférica y activación

Las células T CLA+ se purifican a partir de linfocitos obtenidos de sangre periférica mediante una separación de Ficoll a partir de 60 ml de sangre. Seguidamente se realizan tres separaciones inmunomagnéticas consecutivas utilizando anticuerpos conjugados a partículas magnéticas según el protocolo descrito¹¹. Las dos primeras separaciones eliminan linfocitos CD14, CD19, CD16, y CD45RA, obteniéndose una suspensión celular de linfocitos T de memoria CD45R0. La tercera separación permite escindir las subpoblaciones de células de memoria CLA+ y CLA- de dicha población de linfocitos T de memoria. Los linfocitos purificados se incuban en RPMI 10% FCS y se activan con anti-CD3 y anti-CD28 a razón de 500.000 células/ml.

Transcurridas 48 horas se obtienen los sobrenadantes de estos cultivos y se congelan a -80 °C hasta su posterior utilización para activar los cultivos de queratinocitos.

Cultivo de queratinocitos

Se cultivaron queratinocitos procedentes de biopsias cutáneas según los protocolos previamente publicados. Se incubaron los queratinocitos cultivados (P2-P4) durante 6 horas con o sin estímulo (IFN- γ 100 U/ml o sobrenadantes de células T activadas con anti-CD3/anti-CD28).

Se realizó la extracción del ARN de los queratinocitos cultivados mediante el *kit Gene Elute Mammalian* (Sigma) y se procedió a la realización de cADN mediante el *kit High Capacity cADN Reverse Transcription* (Applied Biosystems) para su posterior análisis por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) mediante ABI7900HT (Applied Biosystems) y procesado de la información con el programa de análisis SDS Ver. 1.0 (Applied Biosystems).

Análisis de la expresión génica en queratinocitos mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Se han evaluado 18 genes en queratinocitos (tabla 1). Los resultados se presentan como RQ (*Relative Quantity*). Este parámetro está normalizado para un *house-keeping gene* interno que es la GAPDH.

Micromatriz multigénica (gene array)

Se realizó un estudio de expresión génica utilizando el sistema de PIQOR Skin Patho microarray de la compañía Memorec (Colonia, Alemania) de queratinocitos de psoriasis incubados con sobrenadantes de linfocitos CLA+ activados con CD3/CD28 y de queratinocitos de psoriasis incubados con sobrenadantes de linfocitos CLA+ no activados, con el objetivo de estudiar diferencias de expresión de 1.127 genes expresados en la piel. Para ello se obtuvo el ARN de los queratinocitos psoriásicos incubados durante 6 horas con sobrenadantes de linfocitos T CLA+ activados o no activados. El ARN de queratinocitos activados con sobrenadantes de linfocitos T CLA+ se marcó con Cy5 y el de los incubados con sobrenadante de linfocitos T CLA+ no activados con Cy3.

Resultados

Activación de queratinocitos psoriásicos y sanos por subpoblaciones de linfocitos memoria (CLA+/CLA-)

Análisis de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

La incubación de queratinocitos con sobrenadantes de las subpoblaciones de células de memoria CLA+/CLA- induce un patrón de expresión génica diferente tal y como se muestra en la tabla 2. De los 18 genes estudiados (tabla 1) los que se ven más aumentados por los linfocitos T CLA+ respecto a los CLA- son IP-10, HLA-DR, ICAM-1 e IL-19 (tabla 2). El resto de los genes estudiados no se afectaban durante las primeras 6 horas de cultivo con sobrenadantes de células T. En los pacientes psoriásicos, respecto a los sujetos sanos, se aprecia una mayor expresión de IP-10, HLA-DR e ICAM-1. En estos experimentos se incluyó el IFN- γ como control de activación. La activación con IFN- γ indica una mayor sensibilidad de queratinocitos psoriásicos respecto a los sanos frente a esta citoquina y reafirma la funcionalidad de los queratinocitos en estos estudios.

Micromatriz multigénica

Los resultados más relevantes de la micromatriz multigénica se expresan en la figura 1 y en la tabla 3 conjuntamente. En la figura se presenta la intensidad de la señal para cada uno de los genes analizados. La intensidad obtenida para cada cADN se muestra en una escala doble-logarítmica. Las diagonales identifican los genes cuya expresión se encuentra aumentada o disminuida. En la tabla 3 se presentan algunos de los genes de los queratinocitos cuya expresión aumenta si se incuban con sobrenadante de linfocitos T CLA+ activados respecto de los incubados con sobrenadantes de linfocitos T CLA+ no activados, y se comenta la relevancia funcional de dichos genes en la patología psoriásica.

Confirmación por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real del resultado de la micromatriz multigénica: iNOS

El gen de la sintasa de óxido nítrico (iNOS) fue uno de los genes que se detectaron aumentados en la micromatriz multigénica y que podría estar inducido preferentemente por los linfocitos T CLA+ psoriásicos en queratinocitos de pacientes. Para determinar su relevancia se realizó la confirmación por RT-PCR. La figura 2 muestra que la condición de sobrenadante de linfocitos T CLA+ activados de pacientes con psoriasis es la que induce más expresión génica en los queratinocitos de las placas psoriásicas.

Discusión

Durante la formación de la placa de psoriasis existe, en primer lugar, la infiltración dérmica por linfocitos, que es seguida de la hiperplasia de la epidermis^{12,13}. Asimismo, en la

Tabla 1. Genes expresados en queratinocitos y analizados inicialmente por RT-PCR

Gen	Relevancia
IL-7	Citoquina relacionada con la inflamación crónica y supervivencia de linfocito T
IL-8	Quimiocina específica de neutrófilos
IP-10	Quimiocina específica de linfocitos T activados
IL-15	Citoquina relacionada con la inflamación crónica
VEGF	Factor pro-angiogénico
ICAM-1	Molécula de adhesión indicadora de activación de queratinocitos
TNF- α	Citoquina proinflamatoria clave en psoriasis
HLA-DR2	Molécula asociada a la presentación de antígenos a los linfocitos T
Psoriasisin	Péptido antimicrobiano natural
TLR1	Receptor asociado a la respuesta inmune innata
TLR2	Receptor asociado a la respuesta inmune innata
TLR5	Receptor asociado a la respuesta inmune innata
IL-19	Citoquina expresada en psoriasis poco caracterizada
IL-20	Citoquina expresada en psoriasis poco caracterizada
CCL-27	Quimiocina específica para linfocitos T CLA+
Ki67	Indicador de proliferación celular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERB-B2	Señalización del crecimiento celular

piel sana distante del borde de la placa se ha observado la existencia de una infiltración significativa por linfocitos T CLA+ CD8+ y linfocitos T CD45RO+, que preceden a la hiperproliferación epidérmica^{14,15}. Estos resultados apoyan la hipótesis del secuestro de los linfocitos T CLA+ en las fases agudas de la psoriasis^{16,17}.

Hasta la actualidad, la influencia de los linfocitos T sobre los queratinocitos se ha estudiado mediante el sistema de generación de líneas o clones de linfocitos T obtenidos a partir de linfocitos presentes en las biopsias^{18,19}. Estos sistemas requieren de la generación de suficientes linfocitos para poder realizar dichos estudios, así como de activaciones artificiales y la utilización de células presentadoras de antígeno que, ciertamente, influyen en el fenotipo de los linfocitos, modificando sus características. En nuestro caso, el estudio de linfocitos T CLA+ purificados a partir de sangre periférica resuelve este problema y permite realizar activaciones *ex vivo*²⁰. Hemos utilizado este modelo para caracterizar las funciones efectoras de los linfocitos T CLA+ en los queratinocitos (de enfermos con psoriasis y

Tabla 2. Expresión génica en queratinocitos inducida por IFN- γ (control de activación) o por sobrenadantes de linfocitos T CLA+/CLA- activados con anti-CD3/anti-CD28.

Genes de queratinocitos	Psoriasis (n = 3)			Controles (n = 2)		
	IFN- γ	CLA+	CLA-	IFN- γ	CLA+	CLA-
IP-10	1.646 \pm 1.281	1.253 \pm 883	447 \pm 314	210 \pm 74,9	722 \pm 1011	79,7 \pm 83,4
HLA-DR	244 \pm 166	53,2 \pm 23,6	28,6 \pm 17,1	144 \pm 173	31,1 \pm 21,8	7,7 \pm 4,1
ICAM-1	46,2 \pm 12,7	63,0 \pm 20,7	18,7 \pm 1,4	12,5 \pm 4,7	14,2 \pm 7,5	4,5 \pm 3,3
IL-19	0,4 \pm 0,06	4,9 \pm 1,9	0,1 \pm 0,08	0,5 \pm 0,2	6,0 \pm 1,9	0,9 \pm 0,5

En los pacientes psoriásicos, respecto de los sujetos sanos, se objetivó una mayor expresión de IP-10, HLA-DR e ICAM-1.

Tabla 3. Algunos genes encontrados en la micromatriz multigénica relevantes en cuanto a la diferencia de expresión entre queratinocitos incubados con sobrenadantes de linfocitos CLA+ activados con CD3/CD28 y de queratinocitos de psoriasis incubados con sobrenadantes de linfocitos CLA+ no activados

Gen	Aumento de expresión*	Función y relevancia en psoriasis
CCL20 (MIP3 alfa) Hs.75498	1,90	MIP3 alfa es una quimiocina específica de CCR6. Los linfocitos T CLA+ son CCR6+ y se encuentran presentes en las lesiones psoriásicas
CCL28 Hs.334633	2,12	CCL28 es un ligando de CCR10. Los linfocitos T CLA+ son CCR10+
iNOS Hs.193788	1,86	iNOS está presente en las lesiones psoriásicas y es producido por queratinocitos y células dendríticas
ALCAM (CD166) Hs.10247	1,70	Es un ligando de CD6 expresado en células T. ALCAM está implicado en la interacción del queratinocito con la célula T
Anfirregulina Hs. 270833	2,36	La anfirregulina es miembro de la familia de EGF. Es un factor autocrino para queratinocitos. En psoriasis la anfirregulina causa la disminución de la actividad de las uniones adherentes (<i>adherents junctions</i>). Ratones transgénicos para anfirregulina presentan un fenotipo psoriásico ²⁶
ACP5 fosfatasa ácida tartrato resistente Hs.1211	2,63	Fosfatasa resistente a tartrato. Este gen puede estar implicado en actividades anti-bacterianas

*Aumento de expresión génica en queratinocitos inducido por sobrenadante de linfocitos T CLA+ activados respecto de queratinocitos incubados con sobrenadantes de T CLA+ no activados.

controles sanos), mediante el análisis de la expresión génica inducida mediante cultivo celular condicionado por linfocitos T CLA+ activados con anti-CD3/anti-CD28.

Los resultados obtenidos sugieren que los linfocitos T CLA+ inducen un perfil de expresión génica en los queratinocitos diferente al de los linfocitos T CLA-. Hemos observado que los genes de la IP-10, HLA-DR, ICAM-1 e IL-19 están significativamente expresados en las lesiones psoriásicas¹⁰. Los resultados de la micromatriz multigénica nos han permitido explorar las posibilidades de nuestro modelo de expresión génica sobre un mayor número de genes en queratinocitos psoriásicos inducidos por células CLA+. Genes como CCL20 y CCL28 son quimiocinas que atraen linfocitos T CLA+^{21,22}. La anfirregulina está claramente

asociada con la patogénesis de la psoriasis²³ y el gen ALCAM está implicado en la interacción del linfocito T con el queratinocito²⁴. Con el fin de asegurar la relevancia de estos genes es preciso confirmar su expresión mediante RT-PCR, tal como hemos procedido con la iNOS. Al comparar la capacidad de inducción de la iNOS en queratinocitos la condición de linfocitos T CLA+ y queratinocitos psoriásicos autólogos es la que genera la mayor cantidad de mRNA para la iNOS.

La expresión de iNOS e IL-19 en los queratinocitos, dos genes involucrados previamente en la patogenia de la psoriasis, no se había relacionado anteriormente con la actividad efectora de los linfocitos T. Estos genes están asociados con la respuesta inmune innata y en nuestro estudio son inducidos por los linfocitos T CLA+ representantes de

la respuesta inmune adquirida. El efecto del IFN- γ sobre la expresión de iNOS e IL-19 es muy inferior al efecto de los sobrenadantes de los linfocitos T CLA+ de pacientes con psoriasis, sugiriendo que existen otros mediadores además del IFN- γ producidos por los linfocitos T CLA+ capaces de inducir su expresión.

La iNOS es una sintasa de óxido nítrico (NO) inducida tras un estímulo. Existen otras dos isoformas que producen NO, ambas constitutivas, que son la NOS tipo cerebral (bNOS) y la NOS tipo endotelial (eNOS)²⁵. En psoriasis se ha detectado un incremento significativo de la expresión de iNOS en piel lesional, en comparación con la piel sana, siendo la expresión de bNOS y eNOS menor (tanto en piel sana como lesional)²⁶. Estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica localizaron el mRNA y la proteína del iNOS en los queratinocitos epidérmicos de las lesiones psoriásicas^{27,28}, así como en la papila dérmica²⁹. La expresión de iNOS, incluida en los queratinocitos, parece estar inducida por diferentes citocinas, entre ellas la IL-8^{26,30}.

La iNOS sintetiza NO, un radical libre que ha sido implicado en la patogenia de diferentes enfermedades inflamatorias, incluida la psoriasis. Se ha descrito que niveles bajos de NO promueven la proliferación de los queratinocitos, mientras que los elevados pueden detener la proliferación e iniciar la diferenciación celular, incluso en los queratinocitos^{31,32}. En la psoriasis, a pesar de la marcada sobreexpresión de iNOS, existe una gran hiperproliferación de los queratinocitos. Este hecho parece indicar que hay una baja actividad de la iNOS sobreexpresada, y por lo tanto una acción antiproliferativa poco efectiva. Bruch-Gerharz et al justifican

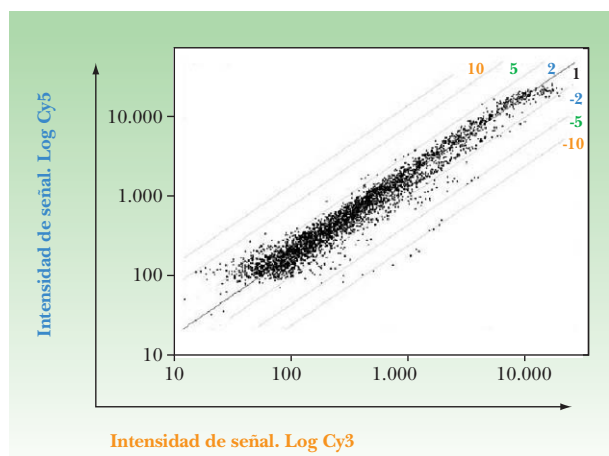
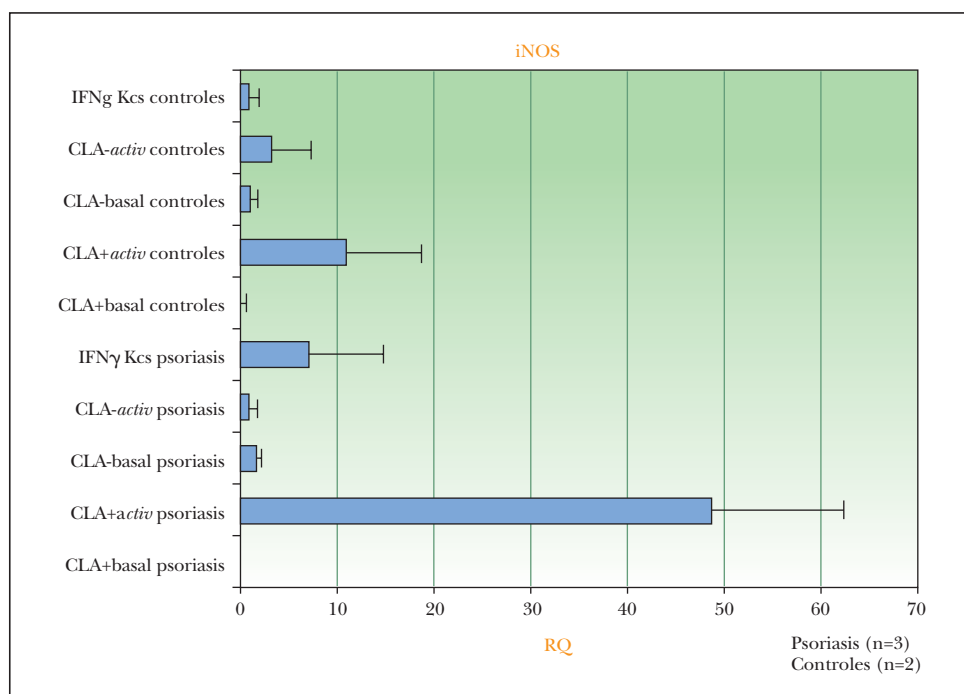


Figura 1. Resultado de la micromatriz multigénica. Cy3: ARN de queratinocitos activados con linfocitos T CLA no activados; Cy5: ARN de queratinocitos activados con linfocitos T CLA+ activados.

este hallazgo aparentemente contradictorio con la arginasa 1 (ARG-1)²⁷. En los queratinocitos psoriásicos la ARG-1 también se encuentra sobreexpresada, colocalizada con la iNOS²⁷. Participa en la regulación de la actividad de la iNOS compitiendo por un sustrato común, la arginina, y produce L-ornitina, como precursor de la síntesis de poliaminas. Se ha descrito que la L-ornitina induce la proliferación de los queratinocitos³¹. Además, la competición de sustrato daría lugar a una baja producción de NO en los queratinocitos. Bruch-Gerharz et al describieron un aumento de la producción de NO al inhibir la actividad de la

Figura 2. Confirmación por RT-PCR del resultado de la micromatriz multigénica en iNOS para las diferentes condiciones de queratinocitos (Kcs) sanos/controles y psoriásicos cultivados: incubados con IFN- γ , con sobrenadantes de linfocitos T CLA+/- activados (*activ*) o basales. La condición de queratinocitos psoriásicos incubados con sobrenadantes de linfocitos T CLA+ autólogos activados genera la mayor cantidad de mRNA para iNOS.



arginasa en queratinocitos en cultivo²⁷, lo que confirmaría la baja actividad de la iNOS en queratinocitos psoriásicos. Otra posible explicación para la baja concentración de NO en queratinocitos sería la sobreexpresión del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en las lesiones psoriásicas, el cual parece suprimir la producción de NO, probablemente a través de la inhibición de la actividad de iNOS³². Contrariamente, algunos autores han descrito el aumento de concentración de NO en la placa de psoriasis, e incluso en el suero de pacientes con psoriasis³³. Sin embargo, estos experimentos analizan la producción total de NO en la piel psoriásica o la cantidad de NO en suero, sin especificar el tipo celular que lo ha producido. Aparte de los queratinocitos existen otras células productoras de NO a través de la iNOS (células dendríticas) y también a través de las otras isoformas enzimáticas (melanocitos, endotelio y glándula sudorípara)²⁹.

La IL-19 forma parte de la familia de citocinas de la IL-10 y se une al receptor heterodímero IL-20R1/IL-20R2. La IL-19 actúa como citoquina proinflamatoria o moduladora de la respuesta inflamatoria innata *in vitro*³⁴. Es capaz de inducir IL-6 y TNF- α en monocitos, dando lugar a una apoptosis mediada por TNF- α ³⁵. En la psoriasis la IL-19 está expresada en epidermis de piel afecta, concretamente en queratinocitos basales y suprabasales localizados en la epidermis suprapapilar. No se ha hallado en monocitos/macrófagos, células endoteliales, melanocitos, células de Langerhans o linfocitos T de las placas de psoriasis³⁶. Asimismo, se ha sugerido que la IL-19 no sólo está producida por los queratinocitos, sino que también actúa sobre ellos³⁷. Se ha demostrado una disminución de la expresión de la IL-19 tras el tratamiento con IL-4³⁸ o ciclosporina³⁹. Estos hallazgos, junto con nuestros resultados de sobreexpresión al ser estimulado por sobrenadante de linfocitos T CLA+ activados, sugieren que la expresión de mRNA de IL19 depende de la presencia de células T no productoras de IFN- γ .

En conclusión, nuestros datos sugieren que los linfocitos T circulantes CLA+ poseen la capacidad de activar queratinocitos psoriásicos induciéndoles la expresión de genes asociados a la respuesta innata y que se han descrito previamente en la lesión psoriásica. Estos resultados apoyan el papel de los linfocitos T en la patogenia de la psoriasis. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que aclaren el significado de las diferencias de expresión génica que hemos observado, así como los mediadores responsables producidos por los linfocitos T.

Conflicto de intereses

Declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Santamaría-Babi LF. CLA (+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol.* 2004;14:13-8.

2. Chen GY, Osada H, Santamaría-Babi LF, Kannagi R. Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2 lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:16894-9.
3. Santamaría-Babi LF. Skin-homing T cells in cutaneous allergic inflammation. *Chem Immunol Allergy.* 2006;91:87-97.
4. Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:699-711.
5. Nickoloff BJ, Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2004;113:1664-75.
6. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature.* 2007;445:866-73.
7. Pont-Giralt M, Giménez-Arnau AM, Pujol RM, Santamaría-Babi LF. Circulating CLA(+) T cells from acute and chronic psoriasis patients manifest a different activation state and correlation with disease severity and extension. *J Invest Dermatol.* 2006;126:227-8.
8. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med.* 2004;199:731-6.
9. Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol.* 1990;136:1053-68.
10. Lew W, Bowcock AM, Krueger JG. Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and «Type 1» inflammatory gene expression. *Trends Immunol.* 2004;25:295-305.
11. Santamaría Babi LF, Moser R, Pérez Soler MT, Picker LJ, Blaser K, Hauser C. Migration of skin-homing T cells across cytokine-activated human endothelial cell layers involves interaction of the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4), and the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) *J Immunol.* 1995;154:1543-50.
12. Parent D, Bernard BA, Desbas C, Heenen M, Darmon MY. Spreading of psoriatic plaques: alteration of epidermal differentiation precedes capillary leakiness and anomalies in vascular morphology. *J Invest Dermatol.* 1990;95:333-40.
13. Ragaz A, Ackerman AB. Evolution, maturation, and regression of lesions of psoriasis. New observations and correlation of clinical and histologic findings. *Am J Dermatopathol.* 1979;1:199-214.
14. Davison SC, Ballsdon A, Allen MH, Barker JN. Early migration of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) positive T cells into evolving psoriatic plaques. *Exp Dermatol.* 2001;10:280-5.
15. Vissers WH, Arndtz CH, Muys L, Van Erp PE, de Jong EM, van de Kerkhof PC. Memory effector (CD45RO+) and cytotoxic (CD8+) T cells appear early in the marginal zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late. *Br J Dermatol.* 2004;150:852-9.
16. Kunstfeld R, Lechleitner S, Groger M, Wolff K, Petzelbauer P. HECA-452+ T cells migrate through superficial vascular plexus but not through deep vascular plexus endothelium. *J Invest Dermatol.* 1997;108:343-8.

17. Biedermann T, Schwarzler C, Lametschwandtner G, Thoma G, Carballido-Perrig N, Kund J, et al. Targeting CLA/E-selectin interactions prevents CCR4-mediated recruitment of human Th2 memory cells to human skin in vivo. *Eur J Immunol.* 2002;32:3171-80.
18. Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. Cooperative growth factors from psoriatic lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes. *J Clin Invest.* 1995;95:317-27.
19. Prinz JC, Gross B, Vollmer S, Trommler P, Strobel I, Meurer M, et al. T cell clones from psoriasis skin lesions can promote keratinocyte proliferation in vitro via secreted products. *Eur J Immunol.* 1994;24:593-8.
20. Santamaría Babi LF, Picker LJ, Pérez Soler MT, Drzimalla K, Flohr P, Blaser K, et al. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med.* 1995; 181:1935-40.
21. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol.* 2000;164:6621-32.
22. Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity.* 2002;16:1-4.
23. Cook PW, Piepkorn M, Clegg CH, Plowman GD, DeMay JM, Brown JR, et al. Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J Clin Invest.* 1997;100:2286-94.
24. Singer NG, Mitra R, Lialios F, Richardson BC, Marks RM, Pesando JM, et al. CD6 dependent interactions of T cells and keratinocytes: functional evidence for a second CD6 ligand on gamma-interferon activated keratinocytes. *Immunol Lett.* 1997;58:9-14.
25. Shimizu Y, Sakai M, Umemura Y, Ueda H. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. *J Dermatol* 1997;24:80-7.
26. Sirsjo A, Karlsson M, Gidlof A, Rollman O, Torma H. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes. *Br J Dermatol.* 1996;134:643-8.
27. Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek C, Beck KF, Pfeilschifter J, Ruzicka T, et al. Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol.* 2003;162:203-11.
28. Arany I, Brysk MM, Brysk H, Tyring SK. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220:618-22.
29. Ormerod AD, Weller R, Copeland P, Benjamin N, Ralston SH, Grabowski P, et al. Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 1998;290: 3-8.
30. Bruch-Gerharz D, Fehsel K, Suschek C, Michel G, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med.* 1996;184:2007-12.
31. Suschek CV, Schnorr O, Kolb-Bachofen V. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? *Curr Mol Med.* 2004;4:763-75.
32. Namazi MR. Explaining decreased nitric oxide production in psoriatic lesions: arginase 1 overexpression versus calcitonin gene-related peptide. *Am J Pathol.* 2003;163:2642.
33. Tekin NS, Ilter N, Sancak B, Ozden MG, Gurer MA. Nitric oxide levels in patients with psoriasis treated with methotrexate. *Mediators Inflamm.* 2006;2006:16043
34. Kotenko SV. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:223-40.
35. Liao YC, Liang WG, Chen FW, Hsu JH, Yang JJ, Chang MS. IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol.* 2002;169:4288-97.
36. Rømer J, Hasselager E, Nørby PL, Steiniche T, Thorn Clausen J, Kragballe K. Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine a or calcipotriol. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1306-11.
37. Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Doecke WD, Volk HD, et al. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp Dermatol.* 2006;15:991-1004.
38. Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, Dugas M, Mailhammer R, van Eden W, et al. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med.* 2003;9:40-6.
39. Otkjaer K, Kragballe K, Funding AT, Clausen JT, Noerby PL, Steiniche T, et al. The dynamics of gene expression of interleukin-19 and interleukin-20 and their receptors in psoriasis. *Br J Dermatol.* 2005;153:911-8.