

## Forschungsabteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie

### ■ Leiter: Prof. Dr. Thomas Werfel

Tel.: 0511/532-5092 • E-Mail: werfel.thomas@mh-hannover.de • [www.mh-hannover.de/immundermatologie.html](http://www.mh-hannover.de/immundermatologie.html)

■ Keywords: Immundermatologie, Allergologie, Dermatitis, Psoriasis, Autoimmunität

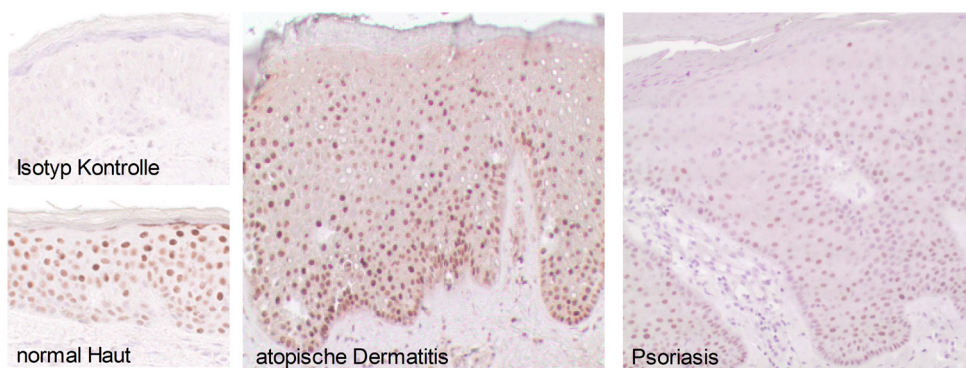
### Forschungsprofil

Der wissenschaftliche Schwerpunkt der Forschungsabteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie liegt in der Untersuchung von allergischen Erkrankungen mit Manifestationen an der Haut, von chronisch-entzündlichen Hautkrankheiten und von Autoimmunerkrankungen der Haut. In den Projekten der Forschungsabteilung stehen derzeit Untersuchungen zu Ekzemkrankheiten (atopische Dermatitis, allergisches Kontaktekzem) und zur Psoriasis im Mittelpunkt. Die Forschungsabteilung wurde im April 2008 innerhalb der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der MHH gegründet. Ihre laufenden Projekte sind naturgemäß thematisch mit der Klinik eng vernetzt, sowohl in Bezug auf die grundlagenorientierten Forschungsprojekte als auch in Bezug auf die klinisch-wissenschaftlichen Projekte. In diesem Forschungsbericht wird eine ausgewählte Thematik dargestellt und eine Auswahl von weiteren Projekten, die im Fokus der Forschungsabteilung stehen, aufgelistet. Um Redundanzen zu vermeiden, wird bei den weiteren Projekten und Publikationen auf den Bericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie verwiesen.

### Ausgewähltes Forschungsprojekt

#### **Die Rolle von GATA3 in humanen primären Keratinozyten für die epidermale Barriere während chronisch entzündlicher Hauterkrankungen**

GATA3 ist ein Transkriptionsfaktor, dem eine Schlüsselfunktion in entzündlichen Hautkrankheiten zugeschrieben wird. Diese Bedeutung von GATA3 wird momentan vor allem mit der Rolle von GATA3 als essentieller Transkriptionsfaktor für Th2-Zellen und der Expression der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 assoziiert. In diesem Zusammenhang konnte 2015 gezeigt werden, dass die transkriptionelle Inhibition von GATA3 zur Verbesserung des persistierenden Asthmas führt (Krug et al, NEJM 2015). GATA3 wird jedoch in der Haut nicht nur von T-Zellen, sondern auch von Keratinozyten exprimiert. In diesem Zelltyp ist bisher nur wenig über die Funktion von GATA3 bekannt. Aktuelle Studien weisen auf eine Rolle von GATA3 in der Steuerung der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten hin. Außerdem wurde GATA3 in Bezug mit entzündlichen Hautkrankheiten gebracht, indem gezeigt wurde, dass nach IL-4-Stimulation GATA3 verstärkt und unter regenerativen und entzündlichen hyperproliferativen Hauterkrankungen wie der Psoriasis vermindert in der Epidermis exprimiert wird. In eigenen Untersuchungen konnten wir außerdem ein verändertes Expressionsprofil von GATA3 unter entzündlichen Erkrankungen in der Haut zeigen: In gesunder Haut findet sich die Hauptexpression von GATA3 im Stratum spinosum und im Stratum granulosum der Epidermis, in der läsionalen Haut von an atopischer Dermatitis erkrankten Patienten ist dagegen eine stark erhöhte GATA3-Expression im Stratum basale zu finden, die Expression im Stratum spinosum und Stratum granulosum ist dagegen erniedrigt (Abbildung 1).



**Abb. 1:** GATA3 wird in der Epidermis von Keratinozyten exprimiert. (A) Die Immunhistochemie von GATA3 zeigt eine klare Lokalisation von GATA3 im Kern der Keratinozyten. In gesunder Haut ist eine zunehmende Expressionsstärke im Stratum spinosum und im Stratum granulosum zu detektieren. (B) In der atopischen Dermatitis ist die GATA3-Expression im Stratum basale stark erhöht. (C) In der Psoriasis dagegen wird eine verminderte GATA3-Expression beobachtet.

Um die Rolle von GATA3 in humanen Keratinozyten zu untersuchen, wurde für diese Studie zunächst das Silencen von GATA3 in humanen primären Keratinozyten etabliert. Keratinozyten wurden lentiviral mit einem Plasmid, das für eine GATA3-spezifische shRNA kodiert, transduziert. Es konnte hiermit eine signifikante Reduktion der GATA3-Expression erreicht werden. Diese Zellen wurden in den weiteren Versuchen mit Keratinozyten, die unter gleichen Konditionen mit einer nonsense Kontroll-shRNA transduziert wurden, verglichen. Um mögliche Gene, die durch GATA3 beeinflusst werden, zu identifizieren, wurden diese Zellen zunächst in einem Screening mittels Mikroarray charakterisiert. Da GATA3 bereits in Zusammenhang mit der Differenzierung von Keratinozyten und der epidermalen Barriere gebracht wurde und Barrieredefekte insbesondere in dem Erkrankungsbild der atopischen Dermatitis zunehmend an Bedeutung gewinnen, haben wir uns in dieser Studie auf Gene, die am Aufbau und Erhalt der epidermalen Barriere beteiligt sind, fokussiert.

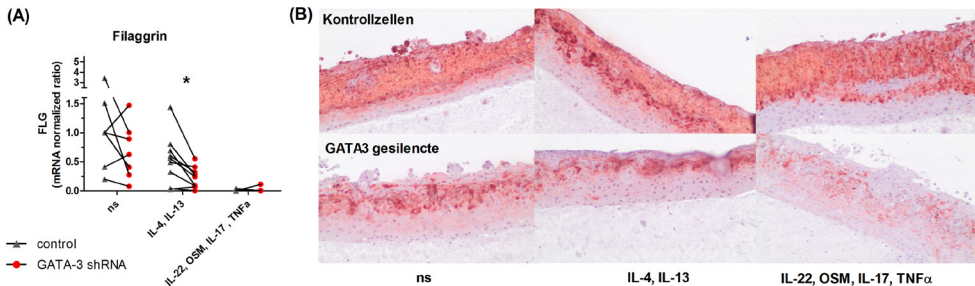
Die Analyse der Mikroarray-Ergebnisse zeigte, dass insbesondere Gene, die zum Gen-Loci des epidermalen Differenzierungskomplexes (eine 2Mb große Region auf dem humanen Chromosom 1q21) gehören, durch die veränderte GATA3-Expression reguliert waren. Es zeigte sich unter anderem eine veränderte Expression der mRNA für die Gene Hornerin (2.5 x erhöht), Involucrin (1.4 x erniedrigt), Loricrin (1.8 x erniedrigt) und Filaggrin (2.5 x erniedrigt). Für Filaggrin-2 zeigte der Mikroarray keine veränderte Regulation. Da Filaggrin-2 aber zusammen mit Hornerin und Filaggrin zur selben Genfamilie gehört, wurde es in die folgenden Untersuchungen mit aufgenommen.

Die Ergebnisse des Mikroarrays wurden im Folgenden per quantitativer RealTime-PCR validiert. Zusätzlich zu den basalen Bedingungen erfolgte hier auch die Untersuchung unter entzündlichen Bedingungen. Zum einen wurden für die Stimulation Konditionen gewählt, die ähnlich der entzündlichen Bedingungen sind, die man in der atopischen Dermatitis vorfindet (Th2-Konditionen: IL-4 und IL-13), zum anderen entsprachen die Konditionen einem Milieu ähnlich der Psoriasis (Stimulation mit den Zytokinen IL-17, IL-22, OSM und TNF $\alpha$ ).

In der quantitativen RealTime-PCR konnten die Tendenzen des Microarrays für Loricrin, Involucrin und Filaggrin bestätigt werden. Für alle drei Targets zeigte sich eine verminderte Expression in den GATA3-gesilenceten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Außerdem konnten wir für Filaggrin zeigen, dass es unter Stimulation mit den Th2-Zytokinen IL-4 und IL-13 zu einer signifikant reduzierten Filaggrin-Expression in den GATA3-gesilenceten Zellen kommt (Abbildung 2A). Für Filaggrin-2 und Hornerin ließ sich keine Tendenz feststellen (Abbildung 2).

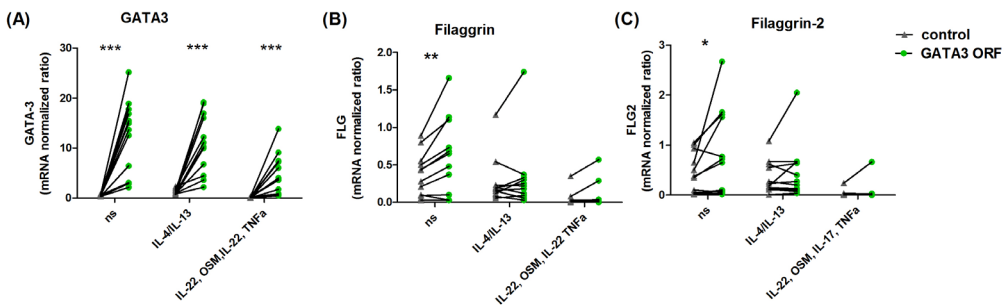
Neben den 2D-Zellkulturanalysen haben wir die Ergebnisse in einem dreidimensionalen Hautmodell überprüft. Das 3D-Hautmodell ermöglicht die Untersuchung unter gewebeähnlichen Konditionen. Hierbei wird ein Dermisequivalent verwendet, das aus Fibroblasten besteht, die in eine Kollagenmatrix eingebettet sind. Auf dieses Dermisequivalent werden

primäre humane Keratinozyten gegeben - in diesem Fall die gesilenceten Keratinozyten bzw. Kontrollzellen. Diese bilden nach 7-tägiger Inkubation eine mehrschichtige Epidermis mit epidermaler Barriere aus. Der Vorteil der Hautmodelle ist, dass hieran auch die Anordnung und Organisation der epidermalen Strukturen untersucht werden können. Auch in diesem Ansatz konnten die Daten für Filaggrin bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutlich verminderte Filaggrin-Expression in den GATA3-gesilenceten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 2B).



**Abb. 2:** Das Silencen von GATA3 in humanen primären Keratinozyten führt zu einer verminderten Filaggrin-Expression. (A) qRT-PCR und (B) immunhistologische Färbungen von 3D-Hautmodellen.

Um die Ergebnisse abschließend zu validieren, wurde in diesem Ansatz GATA3 in Keratinozyten überexprimiert (Abbildung 3A). Hierfür kam ein Plasmid mit ORF für GATA3 bzw. einer Kontrolle zum Einsatz, das transient durch episomale Transfektion in die Zellen eingebracht wurde. Die Expression der Targets Involucrin, Loricrin, Hornerin, Filaggrin und Filaggrin-2 wurde anschließend unter basalen und entzündlichen Bedingungen (analog zum Ansatz mit den gesilenceten Keratinozyten) mittels quantitativer RealTime-PCR bestimmt. Hier zeigte sich für Loricrin und Involucrin nur eine minimale Beeinflussung durch die veränderte GATA3-Expression. Für Hornerin ließ sich keine Beeinflussung feststellen. Filaggrin zeigte dagegen eine signifikant gesteigerte Expression in den GATA3 überexprimierten Keratinozyten im Vergleich zu den Kontrollen unter basalen Bedingungen. Diese Tendenz blieb auch unter entzündlichen Bedingungen erhalten (Abbildung 3B). Interessanterweise konnte durch die Überexpression von GATA3 auch die Filaggrin-2-Expression signifikant hochreguliert werden (Abbildung 3C).



**Abb. 3:** GATA3-Überexpression führt zu einer gesteigerten Filaggrin- und Filaggrin-2-Expression. (A) Überexpression von GATA3 in primären humanen Keratinozyten. (B) Filaggrin- und (C) Filaggrin-2 Expression nach GATA3-Überexpression im Vergleich zu Kontrollzellen.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass GATA3 aktiv an der Genregulation von Filaggrin und Filaggrin-2 beteiligt ist. Die Ergebnisse der Silencing-Experimente, in denen die Filaggrin-2 mRNA-Level sich nicht durch die veränderten GATA3 Level beeinflusst gezeigt haben, zusammen mit den Ergebnissen der Überexpression, in denen GATA3 Filaggrin-2 hochregulierte, lassen schließen, dass GATA3 zwar direkt an der Regulation beteiligt ist, jedoch nicht essentiell für eine Transkription des Genes benötigt wird - andere Faktoren scheinen in der Lage zu sein, bei einem Fehlen von GATA3 dessen Rolle übernehmen zu können. Hingegen scheint GATA3 unter unseren Versuchsbedingungen essentiell für die Transkription von Filaggrin nötig zu sein - bei einem Fehlen dieses Transkriptionsfaktors kommt es, insbesondere unter Th2-Konditionen (IL-4 und IL-13), zu einer signifikant verminderten Filaggrin-Expression. Für die atopische Dermatitis, die oft mit einer verminderten Filaggrin-Expression und einer beeinträchtigten epidermalen Barriere einhergeht, scheint GATA3 hierbei von entscheidender Bedeutung zu sein. Läsional nimmt seine Expression zwar im Stratum basale zu, unter gesunden Bedingungen erfolgt die Induktion und Expression von Filaggrin und Filaggrin-2 aber erst in Keratinozyten höherer Schichten. Hier ist in der atopischen Dermatitis die GATA3-Expression eher vermindert. Diese Misregulation von GATA3 kann somit an den verminderten Filaggrin-Leveln und der beeinträchtigten epidermalen Barriere in der atopischen Dermatitis beteiligt sein. Die nur leichten Veränderungen in der Loricrin- und Involucrin-Expression durch die Modulation der GATA3-Expression weisen nicht unmittelbar auf eine direkte Regulation durch GATA3 hin. Da GATA3 laut der aktuellen Literatur generelle Funktionen in der Differenzierung von Keratinozyten übernimmt, können die leichten Veränderungen hier auch ein genereller Ausdruck der verminderten (Silencing) bzw. erhöhten (Überexpression) Differenzierung der Keratinozyten darstellen.

GATA3 scheint somit wichtige Funktionen für die epidermale Barriere der Haut zu besitzen. Kritisch scheint in diesem Zusammenhang der Einsatz von Kortikosteroiden bei der Behandlung von entzündlichen Hauterkrankungen zu sein, da diese laut Literatur die GATA3-Expression und -Funktion stark einschränken. Inwieweit das auch in Keratinozyten der Fall ist, soll in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); mitarbeitende Wissenschaftlerin: Zeitvogel, Jana (Dr. rer. nat.); Förderung: LOM und Wirtschaft über BMBF KMU innovativ-10: „Innovativer Therapieansatz mittels kombinatorischer Immunmodulation zur Behandlung der atopischen Dermatitis und anderer Ekzemkrankheiten“ (PTJ-Förderkennz. 031A188, Sterna Biologicals GmbH)

### Weitere Forschungsprojekte (mit Stichtag 01.12.2015)

#### **Autoreaktive T-Lymphozyten bei atopischer Dermatitis**

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); beteiligte Wissenschaftler: Rösner, Lennart (Dr. rer. nat.); Heratizadeh, Annice (Dr. med.), Kopfnagel, Verena (Dr. rer. nat.), Zeitvogel, Jana (Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Valenta, Rudolf (Prof. Dr.), Medizinische Universität, Wien, Österreich; Förderung: DFG WE1289/8-2 (Klinische Forschergruppe 250, Teilprojekt 6)

#### **Bioanalytical Services (Analyses of Cells and Mediators in Skin Biopsies) related to the clinical Trial protocols ROF-Derm\_203 & ROF-Psor\_104**

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.), Rösner, Lennart (Dr. rer. nat.); Förderung: Wirtschaft

#### **Nationales Register Atopische Dermatitis im Erwachsenenalter**

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Weidinger, Stefan (Prof. Dr. med.), Kiel; Schmitt, Jochen (Prof. Dr. med.), Dresden; Förderung: Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG) und Wirtschaft

**Schulungsprogramm zur besseren Versorgung von Erwachsenen mit atopischer Dermatitis (Neurodermitis) - Nationale prospektive randomisierte Multizenterstudie**

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.), Heratizadeh, Annice (Dr. med.); Kooperationspartner: Gieler, Uwe (Prof. Dr. med.), Justus-Liebig-Universität Gießen; Förderung: Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG), Wirtschaft

**Rolle von Anaphylatoxinen bei entzündlichen Hautkrankheiten**

■ Projektleitung: Mommert, Susanne (Dr. rer. nat.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.)

**Einfluss von SOCS3 bei entzündlichen Hautkrankheiten**

■ Projektleitung: Zeitvogel, Jana (Dr. rer. nat.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.)

**Effekte von antimikrobiellen Peptiden auf die kutane Entzündung**

■ Projektleitung: Kopfnagel, Verena (Dr. rer. nat.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.)

**T-Zell-vermittelte Reaktion gegen Allergene und mikrobielle Antigene bei der atopischen Dermatitis**

■ Projektleitung: Rösner, Lennart (Dr. rer. nat.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.)

**Originalpublikationen**

**Abstracts**

2015 wurden 5 Abstracts publiziert.

**Auszeichnung**

Preise und Stipendien siehe Forschungsbericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie.

**Weitere Tätigkeiten in der Forschung**

siehe Forschungsbericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie.