

Aus der Abteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie
der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

Die Rolle des Transkriptionsfaktors GATA-3 in der Entwicklung
und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von Neele Jokmin
aus Delmenhorst
Hannover 2022

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 11.01.2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Michael P. Manns

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. med. Thomas Werfel

1. Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. Beate Sodeik

2. Referent/in: Prof. Dr. med. Hagen Ott

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2024

Prüfungsausschuss:

Vorsitz: Prof. Dr. med. Torsten Witte

Prüferin/in: Prof. Dr. med. Bernhard Schmidt

Prüfer/in: Prof. Dr. med. Ludger Leifeld

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	V
III.	Tabellenverzeichnis.....	VI
IV.	Abkürzungsverzeichnis	VII
1	Einleitung	1
1.1	Die Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren	2
1.2	Der Transkriptionsfaktor GATA-3: Immunologische Bedeutung in der Th-Zell-Differenzierung.....	3
1.2.1	Die Rolle des Transkriptionsfaktors GATA-3 in der Differenzierung zu Th2-Zellen	4
1.2.1.1	Regulation der Zytokin-Expression	4
1.2.2	Regulation der Expression von GATA-3 auf Ebene der Transkription.....	5
1.3	Der Transkriptionsfaktor GATA-3: Die immunologische Bedeutung von GATA-3 durch Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere.....	6
1.3.1	GATA-3 Wirkmechanismus auf zellulärer/transkriptioneller Ebene: Homöostase von Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten	7
1.3.1.1	Der p63 / I κ B Kinase- α Signalweg	7
1.3.1.2	Analogie zur Entwicklung von Haarfollikeln	9
1.4	Epidermis.....	10
1.4.1	Der Aufbau der Epidermis	10
1.4.1.1	Keratinozyten – der dominierende Zelltyp der Epidermis	11
1.4.1.2	Str. basale.....	12
1.4.1.3	Str. spinosum	13
1.4.1.4	Str. granulosum.....	14
1.4.1.5	Str. corneum.....	15
1.4.2	Die epidermale Barriere	17
1.4.2.1	Strukturen der epidermalen Barriere: der cornified envelope	17
1.4.2.2	Keratinisierung: Der p63 / IKK- α Signalweg als intrazellulärer Regulationsmechanismus	19
1.5	Chronisch-entzündliche Hautkrankheiten	21
1.5.1	Atopische Dermatitis.....	21
1.5.1.1	Epidemiologie.....	21
1.5.1.2	Ätiologie	21
1.5.1.3	Klinik der atopischen Dermatitis	21
1.5.1.4	Immunhistologie der atopischen Dermatitis	22
1.5.1.5	Pathophysiologie der atopischen Dermatitis.....	22
1.5.1.6	Die epidermale Barriere bei atopischer Dermatitis.....	25
1.5.2	Psoriasis vulgaris.....	25
1.5.2.1	Epidemiologie der Psoriasis.....	25
1.5.2.2	Ätiologie der Psoriasis	26
1.5.2.3	Klinik der Psoriasis.....	26
1.5.2.4	Immunhistologie der Psoriasis.....	26
1.5.2.5	Pathophysiologie der Psoriasis	27
1.5.2.6	Die epidermale Barriere bei Erkrankung an Psoriasis	28
1.6	Zielsetzung	30
2	Methoden	31
2.1	Zellkultur	31

2.2	Auftauen von Keratinozyten	31
2.3	Mediumwechsel der Keratinozyten in den Zellkulturflaschen	31
2.4	Passagieren der Keratinozyten	32
2.5	Einfrieren	33
2.6	Lentivirale Transduktion primärer humaner Keratinozyten	33
2.7	Stimulationsschema der inflammatorischen Konditionen	34
2.7.1	Simulation von inflammatorischen Konditionen – Auswahl verschiedener Bedingungen	35
2.7.2	Optimierung des Stimulationszeitraums.....	37
2.7.3	Optimierung des Stimulationszeitpunkts.....	37
2.7.3.1	Optimierung des Stimulationszeitpunkts in der qRT-PCR	37
2.7.3.2	Optimierung des Stimulationszeitpunkts für Untersuchungen von Keratinozyten mittels Western Blot	37
2.8	3D-Hautmodell	37
2.9	Immunhistochemische Färbungen	38
2.9.1	Fixierung und Einbettung.....	38
2.9.2	Herstellung der Schnitte	39
2.9.3	Entparaffinierung und Rehydratisierung	39
2.9.3.1	Demaskierung des Antigens	39
2.9.3.2	Block.....	39
2.9.4	Indirekte Färbung	39
2.9.5	Immunfluoreszenz-Färbung	40
2.9.6	Verwendete Antikörper und Färbeverfahren.....	40
2.10	Gewinnung von Extrakten aus Keratinozyten	41
2.10.1	Gewinnung von Gesamtzellextrakten.....	41
2.10.2	Gewinnung von Nuklear- und Zytoplasmaextrakten.....	41
2.10.3	Gewinnung von RNA-Extrakten/ RNA-Isolation.....	41
2.11	cDNA-Synthese	42
2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.12.1	Denaturierung	43
2.12.2	Primerhybridisierung/Annealing	43
2.12.3	Elongation	43
2.12.4	Quantitative Real time-Polymerase-Kettenreaktion: Bestimmung der relativen Konzentration mittels $\Delta\Delta CT$ -Methode.....	43
2.13	mRNA Microarray (MA)	45
2.14	Western Blot	47
2.14.1	Elektrophorese.....	47
2.14.2	Blot/Transfer	48
2.14.3	Block	49
2.14.4	Indirekte Antikörpermarkierung/Staining.....	49
2.14.5	Visualisierung/Detektion	50
2.14.6	Membranfärbung	50
2.14.7	Auswertung	51
2.15	Statistische Auswertung	51
3	Material	53
3.1	Zellkulturmedium	53
3.2	Zellkultur	53
3.3	Zellstimulation	54
3.4	3D-Hautmodell	54

3.5	Immunhistologie	54
3.6	Antikörper	55
3.7	Gewinnung von Extrakten	56
3.8	qRT-PCR	56
3.9	Western Blot	56
3.10	Verbrauchsmaterial	57
3.11	Geräte- und Software-Verzeichnis	58
4	Ergebnisse	60
4.1	Etablierung GATA-3 knock down	60
4.2	Identifizierung von GATA3 abhängigen Targets – Auswertung des Microarray	61
4.2.1	Effekt des GATA-3 Silencing	64
4.2.2	Einfluss der GATA-3 Expression auf die Differenzierungsmarker.....	65
4.2.2.1	Genregulation von Filaggrin bei GATA-3-Defizienz	65
4.2.2.2	Genregulation von Loricrin bei GATA-3-Defizienz.....	66
4.2.2.3	Genregulation von Involucrin bei GATA-3-Defizienz	68
4.2.3	Einfluss der GATA-3 Expression auf die Lipidregulation	69
4.2.4	Einfluss der GATA-3 Expression auf Mitglieder der S100-Protein-Familie	70
4.3	Referenzgene – Einfluss der GATA-3 shRNA auf die Expression der housekeeping genes 71	
4.3.1	Auswahl des HKG mittels qRT-PCR unter Stimulationsbedingungen	73
4.3.2	Einfluss von inflammatorischen Konditionen in der Zellkultur auf GATA-3 Expression	74
4.3.3	Expression von GATA-3 unter entzündlichen Bedingungen in transduzierten Keratinozyten	75
4.4	Effekte von GATA3 auf Marker-Gene der epidermalen Barriere	77
4.4.1	Validierung der Microarray Daten mittels qRT-PCR.....	77
4.4.1.1	Filaggrin mRNA in Kontroll- und GATA-3 gesilenceten Zellen unter entzündlichen Bedingungen	78
4.4.1.2	Loricrin mRNA Gehalte in Kontroll- und GATA-3 gesilenceten Zellen unter entzündlichen Bedingungen	80
4.4.1.3	Involucrin mRNA in Kontroll- und GATA-3 gesilenceten Zellen unter entzündlichen Bedingungen	82
4.4.1.4	Einfluss von GATA-3 auf die Expression von Kallikrein-1 mRNA.....	84
4.5	Immunhistochemische Färbungen	85
4.5.1	Immunhistochemische Färbung von GATA-3 am Hautschnitt	85
4.5.2	Immunhistochemische Färbung von GATA-3 am 3D-Hautmodell	86
4.5.3	Immunfluoreszenz-Färbung von Filaggrin am 3D-Hautmodell	87
4.6	Auswertung der Ergebnisse aus Western Blot-Experimenten	88
4.6.1	Etablierung des Western Blot für Filaggrin - Titration des Antikörpers	88
4.6.2	Expression von Filaggrin in Kontroll- und GATA-3 gesilenceten Zellen unter entzündlichen Bedingungen – Veränderungen auf Proteinebene.....	89
5	Diskussion	92
5.1	Diskussion der gewählten Methodik	93
5.2	GATA-3: Bedeutung in der Differenzierung der Keratinozyten – Etablierung der epidermalen Barriere	94
5.2.1	Dysregulation der Differenzierung.....	95
5.2.1.1	Filaggrin.....	95
5.2.1.2	Loricrin	99
5.2.1.3	Involucrin.....	100
5.2.1.4	Zusammenfassung: Regulation der Differenzierungsmarker	101
5.2.1.5	Kallikreine - Desquamation	103

5.2.1.6	Defekte in der Lipidbiosynthese	103
5.2.2	S100-Proteine.....	105
5.2.3	GATA-3 – immunologische Bedeutung: Analogien zwischen Th-Zellen und Keratinozyten	106
6	Zusammenfassung.....	107
7	Literaturverzeichnis.....	109
V.	Danksagungen.....	127
VI.	Curriculum vitae.....	128
VII.	Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung	131

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Th-Zell-Differenzierung	3
Abbildung 2. Signalweg der Th2-Differenzierung	4
Abbildung 3. Modell zweier potentieller Signalwege der p63-Isoformen	8
Abbildung 4. Schematische Darstellung des Aufbaus der Epidermis	11
Abbildung 5. Modell zur Regeneration der Epidermis durch Zellteilung	12
Abbildung 6. Schematische Struktur der epidermalen Barriere	18
Abbildung 7. Schema des CE	19
Abbildung 8. Pathophysiologie der atopischen Dermatitis	23
Abbildung 9. Pathophysiologie der Psoriasis	28
Abbildung 10. Vereinfachte Darstellung des Stimulationsschemas	35
Abbildung 11. Etablierung GATA-3 knock down in primären humanen Keratinozyten	60
Abbildung 12. Reduktion der GATA-3 mRNA durch lentivirales Silencing	64
Abbildung 13. Reduzierte FLG mRNA Gehalte nach GATA-3 knock down	65
Abbildung 14. LOR mRNA Repression nach GATA-3 knock down	66
Abbildung 15. GATA3 knock down zeigt einen negativ regulatorischen Effekt auf die IVL Expression	68
Abbildung 16. AGPAT mRNA Repression nach GATA-3 knock down	69
Abbildung 17. Vermehrte Expression von S100A12 und S100A10 in Keratinozyten mit GATA-3 knock down.	70
Abbildung 18. Einfluss des GATA-3 knock down auf die Expression verschiedener geläufiger HKG	72
Abbildung 19. Vergleich der CP-Werte der HKGs RPS20 und PGK-1 unter verschiedenen inflammatorischen Konditionen	73
Abbildung 20. GATA-3 Expression unter pro-inflammatorischen Konditionen	74
Abbildung 21. Stimulation von Keratinozyten unter inflammatorischen Konditionen im Zeitverlauf	75
Abbildung 22. GATA3 shRNA behandelte Keratinozyten zeigen auch unter inflammatorischen Konditionen verminderte GATA3 mRNA Gehalte	76
Abbildung 23. Verminderte FLG mRNA Gehalte in GATA3 gesilenceten primären humanen Keratinozyten	79
Abbildung 24. Verminderte LOR mRNA Gehalte in GATA3 gesilenceten Keratinozyten unter unterschiedlichen inflammatorischen Konditionen	81
Abbildung 25. IVL mRNA Gehalte in GATA3 gesilenceten Keratinozyten unter unterschiedlichen inflammatorischen Konditionen	83
Abbildung 26. KLK1-mRNA Gehalte in in GATA3 gesilenceten Keratinozyten und Kontrollzellen unter basalen Bedingungen und nach Ca^{2+} -Stimulation	84
Abbildung 27. Immunhistologie: Detektion von GATA3 in der Epidermis gesunder Spender.	85
Abbildung 28. Immunhistochemische Färbung von GATA-3 eines exemplarisch ausgewählten Hautmodells	86
Abbildung 29. Modulation der FLG Proteingehalte in 3D-Hautmodellen mit GATA3 knock down unter entzündlichen Konditionen	87
Abbildung 30. Titration des FLG-Ak für den WB	88
Abbildung 31. Exemplarische Darstellung des FLG-Western Blot in inverser Farbgebung	89
Abbildung 32. GATA3 gesilenceten primäre humanen Keratinozyten zeigen unter AD-ähnlichen Konditionen signifikant verminderte FLG Proteingehalte	90

Für sämtliche abgedruckte Abbildungen liegt die Genehmigung der jeweiligen Herausgeber zur Reproduktion in dieser Dissertationsarbeit vor.

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Initiales Stimulationsschema der Keratinozyten	36
Tabelle 2. Finales Stimulationsschema der Keratinozyten	36
Tabelle 3. In der Immunhistologie verwendete Antikörper	40
Tabelle 4. Targets der qRT-PCR	45
Tabelle 5. Targets des Western Blot	50
Tabelle 6. Zellkulturmedien	53
Tabelle 7. Materialien der Zellkultur	53
Tabelle 8. Materialien der Zellstimulation	54
Tabelle 9. Materialien des 3D-Hautmodells	54
Tabelle 10. Materialien der Immunhistologie	54
Tabelle 11. Verwendete Antikörper	55
Tabelle 12. Materialien zur Gewinnung von Extrakten	56
Tabelle 13. Verwendete Primer	56
Tabelle 14. Materialien des Western Blot	56
Tabelle 15. Verbrauchsmaterialien.	57
Tabelle 16. Geräte- und Software-Verzeichnis	58
Tabelle 17. Anzahl der hoch- und herunterregulierten Gene	62
Tabelle 18. Exemplarische Darstellung der Daten des MA	63
Tabelle 19. GATA-3 mRNA Gehalte	64
Tabelle 20. FLG mRNA Gehalte	66
Tabelle 21. LOR mRNA Gehalte	67
Tabelle 22. IVL mRNA Gehalte	68
Tabelle 23. AGPAT6 mRNA Gehalte	69
Tabelle 24. mRNA Gehalte von S100A12 und S100A10	70
Tabelle 25. mRNA Gehalte der HKG	72
Tabelle 26. Prozentuale Darstellung der GATA-3 mRNA Regulation unter Psoriasis- und AD-Kondition	76
Tabelle 27. Prozentuale Darstellung der FLG mRNA Regulation unter Psoriasis- und AD-Kondition	79
Tabelle 28. Prozentuale Darstellung der LOR mRNA Regulation unter Psoriasis- und AD-Kondition	81
Tabelle 29. Prozentuale Darstellung der IVL mRNA Regulation unter Psoriasis- und AD-Kondition	83

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung, Übersetzung
ACTB	<i>Beta-actin</i> , Beta-Aktin (Aktin-Isoform)
AG	Antigen
AJ	<i>Adhering junction</i> : Adherens Junction
AGPAT	<i>Acylglycerol-3-phosphate O-Acyltransferase</i> : 1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase
Ak	Antikörper
ALI	<i>Air-liquid interface</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
AP-1	<i>activator protein-1</i>
BSA	bovines Serum Albumin
BM	<i>basal membrane</i> , Basalmembran
CAPN	Calpain
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Einteilung der Oberflächenmoleküle
cDNA	<i>complementary DNA</i> : komplementäre DNS
CD4⁺	CD4 ⁺ T-Zellen
CD8⁺	CD8 ⁺ T-Zellen
CE	<i>cornified envelope</i>
CLA	<i>cutaneous lymphocyte antigen</i>
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DRR	<i>distal regulatory region</i>
DANN	<i>deoxyribonucleic acid</i> : Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> ; Nährmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EPU	<i>epidermal proliferative unit</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
EZR	extrazellulärer Raum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> : Durchflusszytometer
FCS	fötales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FLG	<i>filament aggregating protein</i> , kurz: Filaggrin
FOG	<i>Friend of GATA</i>
FSC	<i>forward light scatter</i> : Vorwärtsstreulicht
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFI1	<i>growth factor independent-1</i>

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HBD	<i>human Beta-defensin</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HKG	<i>housekeeping gene</i> : Haushaltsgen
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IDEC	inflammatorische dendritische Zellen
Ig	Immunglobulin, Antikörper
IKK-α	I κ B Kinase- α
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IVL	Involucrin
LB	<i>lamellar bodies</i> , lamelläre Granula
LC	Langerhans-Zelle
LOR	Loricrin
MA	Microarray
mAK	monoklonaler Antikörper
mDC	<i>myeloid dendritic cell</i>
MHC	major histocompatibility complex
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaOH	Natriumhydroxid, ergibt in Lösung Natronlauge
NC	Nitrocellulose
NE	Nuklearextrakte
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Nip45	<i>NFAT-interacting protein</i>
NMF	<i>natural moisturizing factor</i>
n.s.	nicht stimuliert
n.t.	nicht-transduziert, nativ
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> : Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> : Polymerase-Kettenreaktion
pDC	<i>plasmacytoid dendritic cell</i> : plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PGK-1	Phosphoglyceratkinase-1

PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	<i>real-time quantitative PCR</i> : quantitative Echtzeit-PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> : Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROG	<i>Repressor of GATA-3</i>
RPS20	<i>ribosomal protein S20</i> , ribosomales Protein S20
RT	Reverse Transkription, auch: Reverse Transkriptase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i> : RNA-Molekül, das eine Haarnadelstruktur bildet
SPR	<i>small proline-rich</i>
Sp1	benannt nach Aufreinigungsschema über Sephacryl- und eine Phosphocellulose Säule, auch: <i>specificity protein</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Str.	<i>Stratum</i>
TBST	Tris-buffered Saline mit Tween
T-bet	<i>T-box expressed in T-cells</i> (T-bet)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>transforming growth factor</i> : transformierender Wachstumsfaktor
Th0	Th0-polarisierte/ nicht polarisierte T-Helfer-Zellen
Th1	Th1-polarisierte T-Helfer-Zellen
Th2	Th2-polarisierte T-Helfer-Zellen
Th17	Th17-polarisierte T-Helfer-Zellen
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> : Tumor-Nekrose-Faktor
T_{reg}	regulatorische T-Zelle
VE- H₂O	vollentsalztes Wasser

1 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung des Transkriptionsfaktors GATA-3 in der Entstehung und Chronifizierung von Hautkrankheiten wie der atopischen Dermatitis und der Psoriasis. Zunächst soll der Transkriptionsfaktor GATA-3 allgemein vorgestellt werden, bevor auf seine Rolle in der Differenzierung von Keratinozyten und somit der Etablierung einer funktionellen epidermalen Barriere eingegangen wird. Unerlässlich hierfür ist ein grundlegendes Verständnis der epidermalen Strukturen, das im Folgenden ebenfalls vermittelt werden soll. Auch soll ein Überblick über die genannten chronisch-entzündlichen Hautkrankheiten gegeben werden; insbesondere immunologische Aspekte, pathophysiologische Grundlagen sowie die Relevanz der epidermalen Barriere sollen differenzierter erläutert werden.

1.1 Die Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren lässt sich anhand ihrer Funktion grob in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen gibt es die Mitglieder der GATA-Familie, denen eine Bedeutung vor allem bei der Reifung hämatopoetischer Zelllinien zukommt. Hierzu zählen die Transkriptionsfaktoren GATA-1, GATA-2 und GATA-3 [1, 2]. Dem gegenüber stehen die Transkriptionsfaktoren GATA-4, GATA-5 und GATA-6, die vor allem zur embryonalen Organentwicklung von Leber, Lunge, Pankreas, Darm und Herz beitragen [1, 3, 4].

Durch die Bedeutung in der Reifung der hämatopoetischen Zelllinien wird GATA-3 den hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren zugeteilt [5–10]. Trotzdem ist GATA-3 auch in der Embryonalentwicklung von Nieren, Nebennieren und dem Nervensystem relevant und gilt unter diesem Aspekt als gewebespezifisch [6, 7]. Der absolute GATA-3-Mangel in der embryonalen Entwicklung ist nicht mit dem Leben zu vereinbaren. Die letale Wirkung resultiert aus der assoziierten Noradrenalin-Defizienz sowie dem totalen Block der T-Zell-Differenzierung [7, 11, 12]. GATA-3 ist der einzige Transkriptionsfaktor aus der GATA-Familie, dessen Expression in Keratinozyten nachgewiesen werden konnte [13].

Alle Mitglieder der GATA-Familie erkennen die Bindungsstelle für GATA: 5'-(A/T)GATA(A/G)-3', bezeichnet als WGATAR [13, 14]. So ist die Heraufregulation von *targets*, die durch GATA-3 reguliert werden, nicht exklusiv durch GATA-3 möglich, sondern ebenfalls durch weitere Mitglieder der GATA-Familie, wie GATA-1, GATA-2 und GATA-4, im Sinne eines „*functional overlap*“ [15].

Die quartäre Proteinstruktur des Transkriptionsfaktors GATA-3 weist zwei Zinkfingerdomänen auf [16]. Dabei handelt es sich einmal um eine N-terminale Zinkfingerdomäne, die zweite Zinkfingerdomäne ist am C-Terminus lokalisiert [15]. Die C-terminale Zinkfingerdomäne ist essentiell für die Bindung an DNA [17]. Der N-terminalen Zinkfingerdomäne wird hingegen eher ein supportiver Effekt für die Aktivität des Transkriptionsfaktors zugeschrieben, da die Interaktion mit DNA durch die Bindung von Co-Faktoren indirekt regulatorisch wirkt [17, 18]. Das Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors GATA-3, speziell der Bindungsdomäne, ist im Genom vieler Wirbeltiere hoch-konserviert erhalten [19–23].

1.2 Der Transkriptionsfaktor GATA-3: Immunologische Bedeutung in der Th-Zell-Differenzierung

Die Bedeutung von GATA-3 unter dem immunologischen Aspekt der Th2-Zell-Differenzierung wurde erstmals 1997 von Zheng und Flavell beschrieben. Sie entdeckten die gesteigerte Expression von GATA-3 während der Differenzierung zu Th2-Zellen [24].

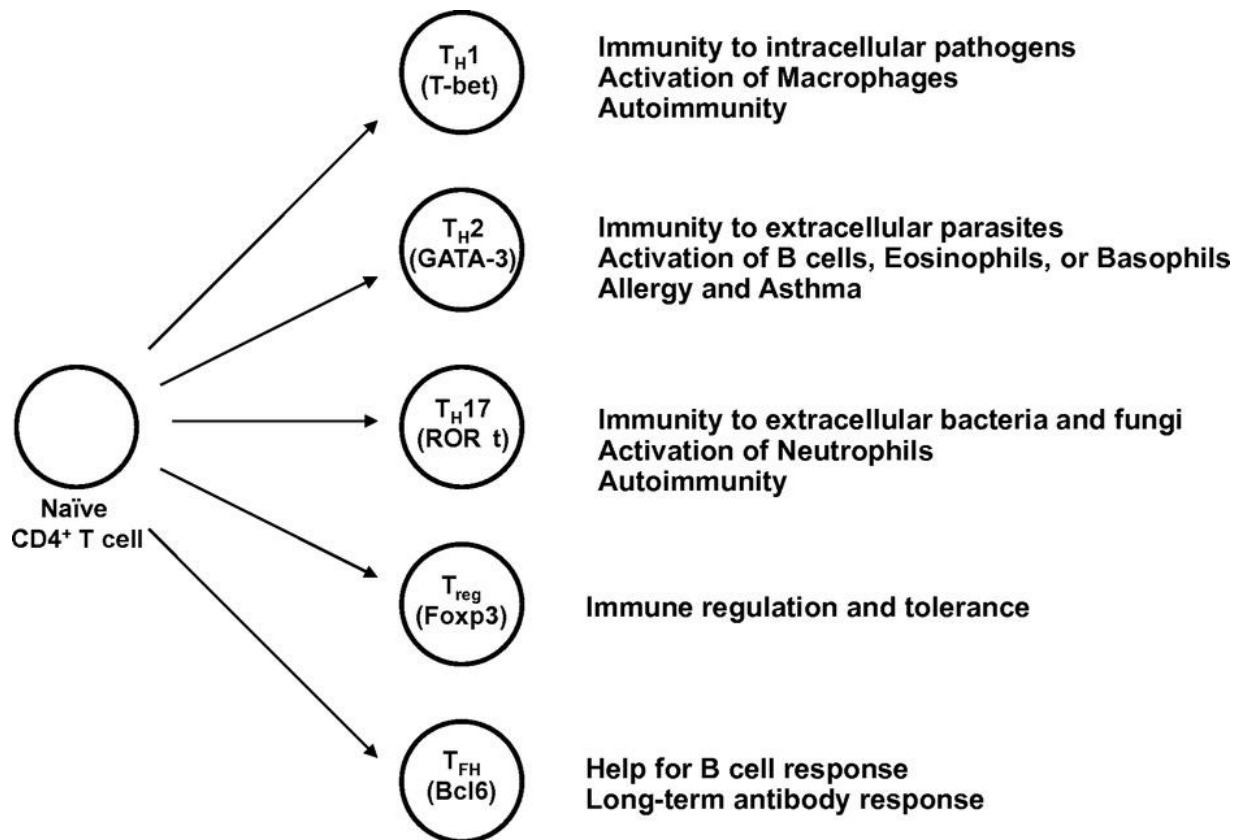


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Th-Zell-Differenzierung. Die Richtung der Th-Zell-Differenzierung wird durch verschiedene Signalwege über Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Richtungsweisend für die Differenzierung zu Th1-Zellen ist der Transkriptionsfaktor T-bet. Für die Entwicklung von Th2-Zellen ist GATA-3 von zentraler Bedeutung. Diese Abbildung ist die Figure 1 aus Ise 2016, Referenz 25.

Naïve CD4⁺ T-Zellen sind generell in der Lage in verschiedene Subtypen zu differenzieren. Neben der Entwicklung zu Th1- oder Th2-Helferzellen, ist auch die Differenzierung zu T_{reg}-, Th17-, Th22- oder Th9-Zellen möglich [24, 26, 27]. Während früher Entwicklungsphasen können sie sowohl Th1- als auch Th2-spezifische Zytokine produzieren [28, 29]. Durch die relativ hohe Expression von GATA-3 während der Proliferation wird eine Kontrollfunktion in der frühen T-Zell-Differenzierung angenommen (**Abbildung 1**) [30–32].

1.2.1 Die Rolle des Transkriptionsfaktors GATA-3 in der Differenzierung zu Th2-Zellen

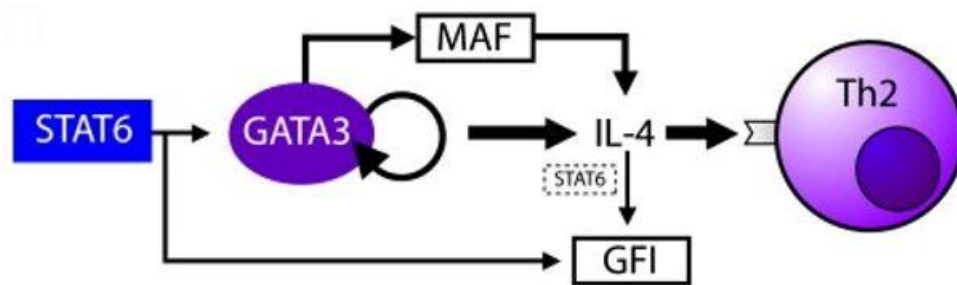


Abbildung 2. Signalweg der Th2-Differenzierung. Die Differenzierung zu Th2-Zellen erfolgt über den IL-4/STAT6-Signalweg, in dessen Verlauf GATA-3 hochreguliert wird. Anschließend ist die (Auto-)Induktion von GATA-3 über einen positiven *feedback loop* möglich. Diese Abbildung ist die Figure 2B aus Chatila 2008, Referenz 33. GFI unterstützt die Expansion GATA-3 exprimierender Zellen [34].

GATA-3 spielt eine Schlüsselrolle in der Th2-Zell-Differenzierung, die insbesondere durch den positiv-regulatorischen Effekt auf die IL-4-Transkription zurückzuführen ist (**Abbildung 2**) [15, 35]. Im Sinne eines *chromatin remodeling* am Th2-Locus kommt es zur Aktivierung des IL-4/STAT6-Signalwegs, der zur Induktion der Th2-Zell-Differenzierung führt. In Folge werden die Th2-spezifischen Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 hochreguliert [15, 24, 36]. Zu den Zielstrukturen des IL-4/STAT6-Signalweges gehört zudem der Transkriptionsfaktor GATA-3, dessen Expression im Sinne eines selbstverstärkenden Prozesses erhöht wird [10, 37, 38]. Angenommen wird ein Schwellenwert, bei dessen Überschreitung es zur Autoinduktion kommt [39]. GATA-3 kann auch unabhängig von der Stimulation durch Zytokine die Initiation der Th2-Differenzierung herbeiführen [38, 40].

Zudem ist für GATA-3 ein inhibierender Effekt auf die Expression von T-bet beschrieben. Infolgedessen ist auch die Expression von Th1-Zytokinen reduziert [34, 41].

1.2.1.1 Regulation der Zytokin-Expression

Die Transkription des IL-4-Gens wird durch einen Transkriptionskomplex aktiviert, in den GATA-3 involviert ist [42]. GATA-3 kann die Transkription von IL-4 direkt aktivieren, wobei möglicherweise lediglich eine moderate Erhöhung der IL-4-Produktion die Folge ist [24, 42]. Eine signifikante Erhöhung der IL-4-Produktion wird erst per Transaktivierung durch Th2-spezifische Transkriptionskomplexe (c-Maf, Nip45, NFAT) erreicht, so dass GATA-3 eine permissive Funktion einnimmt [42–44].

Die Regulation der Expression von IL-5 ist komplex. Drei verschiedene Bindungsstellen für GATA-3 sind im menschlichen Genom beschrieben. Die Bindung an zwei dieser Regionen wirkt sich positiv auf die Expression aus. Die Bindung an die dritte Bindungsstelle ist als negativ regulatorisch beschrieben [45]. Dennoch wirkt GATA-3 direkt regulatorisch auf die

Expression von IL-5 [46–48]. Durch Bindung an ein GATA-Element, das dem *conserved lymphokine element 0* (CLE0)-Element vorgeschaltet ist, induziert GATA-3 die Expression von IL-5 [36].

GATA-3 scheint ebenfalls positiv regulatorisch an der Expression von Interleukin-13 beteiligt zu sein [40]. Die Promoterregion von IL-13 weist Bindestellen für GATA-3 auf, die aktivierend auf die Transkription wirken [42]. Über Besetzung mehrerer Bindestellen ist die Expression von GATA-3 modulierbar. Werden alle Bindestellen besetzt, steigt die Affinität mit dem Ergebnis einer verstärkten Transkription [49].

1.2.2 Regulation der Expression von GATA-3 auf Ebene der Transkription

Die Aktivität von GATA-3 kann in Lymphozyten durch Bindung von Co-Faktoren an die N-terminale Zinkfingerdomäne reguliert werden. Zu diesen Co-Faktoren zählen *Friend of GATA-1* (FOG-1) und *Friend of GATA-2* (FOG-2), die entsprechend als potentielle Faktoren zur Regulation der Th2-Differenzierung gewertet werden können [39, 50–53]. Für FOG-1 ist ein negativ regulatorischer Effekt auf die Differenzierung zu Th2-Zellen in CD4⁺ Th-Zellen beschrieben, entsprechend wirkt der Faktor so inhibierend auf die Th2-Zell-Differenzierung [39].

Das nur in Lymphozyten vorkommende Gen *Repressor of GATA-3* (ROG) wird durch Stimulation mit anti-CD3 exprimiert. ROG hat eine inhibierende Wirkung auf die Expression von Th2- und Th1-Zytokinen [54, 55]. Auf diese Weise moduliert es die Immunantwort [39, 56].

1.3 Der Transkriptionsfaktor GATA-3: Die immunologische Bedeutung von GATA-3 durch Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere

Neben der hohen Bedeutung von GATA-3 in Bezug auf die Polarisierung von naiven CD4⁺-Zellen zu Th2-Zellen, nimmt der Transkriptionsfaktor ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere ein [57]. GATA-3 wird in humanen Keratinozyten der suprabasalen Schichten exprimiert, laut einigen Autoren auch in basalen Schichten [1, 58–60]. Durch einen Effekt auf Signalwege über p63, IκB Kinase-α (IKK-α) und SMAD-Proteine kommt GATA-3 eine zentrale Funktion in der Aufrechterhaltung der Homöostase von Proliferation, Migration und Differenzierung der Keratinozyten zu [1, 61]. Diese Funktion ist nicht nur unter physiologischen Bedingungen relevant, sondern kommt ebenfalls in der Regeneration nach physikalischer Belastung wie genotoxischem Stress durch ionisierende Strahlung oder mechanische Beeinträchtigung zum Tragen [16]. Genaue Funktionsmechanismen und Zielstrukturen des Transkriptionsfaktors sind dabei jedoch noch nicht hinreichend geklärt.

Es darf angenommen werden, dass GATA-3 für die Entstehung der Haut in mehrfacher Hinsicht von hoher Bedeutung ist. Ähnlich wie das Differenzierungsverhalten der Th0-Zellen, dem richtungsweisenden Aspekt der Immunreaktion, dirigiert GATA-3 die Morphogenese der Keratinozyten in der inneren Wurzelhülle von Haarfollikeln sowie deren Aufrechterhaltung [57, 60, 62]. Dementsprechend stellt sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor in der Entwicklung der interfollikulären Keratinozyten eine analoge Funktion einnimmt.

Erste Untersuchungen zu der Fragestellung, welchen Beitrag GATA-3 zur Integrität der epidermalen Barriere leistet, wurden am Mausmodell durchgeführt. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es bei *K14-GATA-3^{-/-}* Mäusen (Deletion von GATA-3 speziell in Epidermis und Haarfollikeln) zu einer gestörten Entwicklung der epidermalen Barriere kommt. Nach einer verzögerten Reifung weisen die Hautpräparate mit zunehmendem Alter der Maus eine Verdickung aller Hautschichten auf, die im *Str. corneum* als Hyperkeratose bezeichnet wird [62]. Mutationen des GATA-3-Gens führen zu einer Retardierung im Differenzierungsverhalten der Keratinozyten und zu schwerwiegenden Defekten der Lipid-Biosynthese [63]. Erschwert werden Untersuchungen von GATA-3 durch die letale Wirkung der kompletten Defizienz im Embryonalstadium. Diese Beobachtungen machen GATA-3 zu einem bedeutungsvollen Faktor in der Regulation und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere. Zunehmend richtet sich der Fokus auf die Bedeutung der Expression und Regulation des Transkriptionsfaktors in der humanen Epidermis.

1.3.1 GATA-3 Wirkmechanismus auf zellulärer/transkriptioneller Ebene: Homöostase von Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten

Die ständige Erneuerung der Epidermis ergibt sich aus einem komplexen Zusammenspiel von Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten. Verschiedene Transkriptionsfaktoren tragen zu der „Programmierung“ der Zellen bei, die für eine balancierte epidermale Regeneration sorgt. Für den potentiellen GATA-3-Signalweg wird insbesondere die Interaktion mit IKK- α in Hinblick auf einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation diskutiert [64].

Innerhalb der Zelle zeigt sich eine Dependenz der Lokalisation von GATA-3 zum Zellstadium. Während des Differenzierungsprozesses akkumuliert der Transkriptionsfaktor und ist ausschließlich im Nukleus nachweisbar. Hingegen liegt er während der Proliferation in Nukleus und Zytoplasma vor. Der Schluss auf eine aktive Beteiligung von GATA-3 an der genetischen Regulation der Differenzierung ist naheliegend [59]. Dementsprechend ist stimmig, dass eine erhöhte Expression von GATA-3 mit einem Anstieg von TAp63 und Keratin 10 (K10), Differenzierungsmarkern der Keratinozyten, verbunden ist [1].

Die verspätete Expression von frühen (Keratine K1 und K10) und späten (Involucrin [IVL] und Loricrin [LOR]) Differenzierungsmarkern auf mRNA- und Protein-Ebene bei GATA-3 Defizienz weist ebenfalls auf eine Dependenz der regelrechten Differenzierung zum Transkriptionsfaktor hin. GATA-3 scheint an der Induktion dieser Proteine während der Differenzierung beteiligt zu sein [60].

Das Ausschalten des GATA-3-Genabschnitts zeigt generell einen positiv regulatorischen Effekt auf die Proliferation der Keratinozyten, respektive zeigt sich ein negativ regulatorischer Effekt von GATA-3 auf die Proliferation [16, 60]. In Übereinstimmung ist die Beobachtung, dass GATA-3 unter regenerativen und (inflammatorisch bedingt) hyperproliferativen Konditionen eine Herunterregulation erfährt [59].

1.3.1.1 Der p63 / I κ B Kinase- α Signalweg

Von zentraler Bedeutung für die Regulation der epidermalen Regeneration ist der Transkriptionsfaktor p63 aus der p53-Familie als Teil der I κ B Kinase- α -Kaskade (**Abbildung 3**) [65–67]. Der Verlust von p63 geht mit einer gestörten epidermalen Barriere einher [60].

Bei TAp63 handelt es sich um eine Isoform von p63, einem Mitglied der Familie der p53-Protoonkogene. Durch eine N-terminale Transaktivierungsdomäne in der Promoterregion unterscheidet sich TAp63 von einer weiteren Isoform des p63. Die zweite Isoform besitzt keine solche Transaktivierungsdomäne, sie wird deshalb als Δ Np63 bezeichnet. Beide Isoformen wirken auf die I κ B Kinase- α (IKK- α), deren Promoterregion direkte Bindestellen für die p63-Isoformen aufweist [61, 68, 69]. IKK- α ist für die Entwicklung der Epidermis essentiell. Unklar ist bisweilen, welchen Beitrag die jeweiligen p63-Isoformen zur Bildung der Epidermis leisten [70]. Dass auch sie im Differenzierungsprozess der Keratinozyten durch die Interaktion mit IKK- α eine essentielle Funktion übernehmen, wurde durch Betrachtungen eines murinen Modells belegt: Hier erweist sich die p63^{-/-} Defizienz embryonal als letal. Neben einer Dysmelie

leiden die Tiere unter dem kompletten Verlust der Oberhaut, so dass die Geburt auf Grund von Dehydratation nicht mit dem Leben vereinbar ist [66, 67].

Für die Entwicklung der Epidermis ist der IKK- α -Enzymkomplex auch für den Menschen essentiell. Der Verlust von IKK- α geht mit dem Ausbleiben der Keratinozyten-Enddifferenzierung einher. Die Expression später Differenzierungsmarker ist nicht mehr möglich [61, 71]. IKK- α weist neben der Funktion als Proteinkinase ebenfalls solche Effekte auf, die als unabhängig von der Proteinkinase-Aktivität zu betrachten sind. Diese Proteinkinase-unabhängigen Effekte werden für die terminale Differenzierung als entscheidend angesehen [71–73].

Interessanterweise weist die Promoterregion von IKK- α im murinen Genom neben den Bindestellen für p63 ebenfalls 4 Bindestellen für GATA-3 auf. TAp63 und Δ Np63 wiederum aktivieren den GATA-3 Promoter. Ein indirekter positiv regulatorischer Effekt von p63 über GATA-3 auf IKK- α kann angenommen werden [61], siehe **Abbildung 3**.

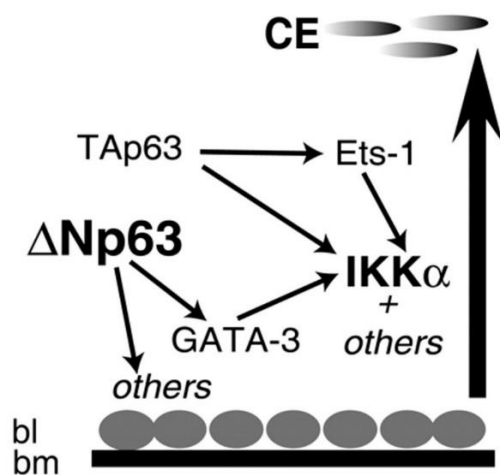


Abbildung 3. Modell zweier potentieller Signalwege der p63-Isoformen. Während TAp63 direkt aktivierend auf IKK- α wirken kann (neben einer Trans-Aktivierung über Ets-1), ist der Effekt von Δ Np63 auf IKK α indirekt über GATA-3. Δ Np63 ist GATA-3 in der Regulation der Differenzierung der Keratinozyten folglich vorgeschaltet. Trotz unterschiedlicher Signalwege wirken die p63-Isoformen synergistisch. bm: Basalmembran, bl: basale Zellschicht der Keratinozyten. Diese Abbildung ist die Figure 5 aus Candi 2006, Referenz 61.

1.3.1.2 Analogie zur Entwicklung von Haarfollikeln

GATA-3 hat sich im Mausmodell als von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Haarfollikeln erwiesen. Die Koordination der Stammzellentwicklung und -bestimmung wird dem Transkriptionsfaktor zugeschrieben. Der Verlust von GATA-3 geht mit aberrantem Wachstum und gestörter Organisation der Haarfollikel einher. Ebenfalls werden Unterschiede in der Pigmentierung festgestellt. Interessanterweise war in GATA-3-defizienten Mäusen die Anzahl an Haarfollikeln nicht reduziert. Dieser Verhalt spricht gegen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Haarfollikel/Organe. Eher scheint GATA-3 auch in diesem System für die Zelldifferenzierung und damit die balancierte Homöostase unabdingbar. Mit dieser These übereinstimmend ist die Beobachtung, dass die Epidermis der K14-GATA3^{-/-} Mäuse eine Hyperplasie und Hyperkeratose aufweist. Dabei ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Funktion von GATA-3 in Haarfollikeln nicht mit der Funktion in der Epidermis gleichzusetzen ist [62].

1.4 Epidermis

Die Epidermis, auch Oberhaut genannt, dient der Abgrenzung des Individuums gegen die Außenwelt, so dass man in Hinblick auf ihre Funktion auch von der epidermalen Barriere spricht. Als äußerste Schicht der Haut von Säugetier und Menschen schützt sie den Körper vor Umwelteinflüssen. Um dieser Rolle gerecht zu werden, unterliegt die Epidermis einem kontinuierlichen Erneuerungsprozess [74]. Hierfür ist die Regulation der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung von besonderem Interesse. Die Koordination von Entwicklung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere in einem sich selbst kontinuierlich erneuernden Organ ist für ihre Funktion essentiell [62].

Zu den physikalischen und chemischen Belastungen, denen das Individuum ausgesetzt ist, zählen UV-Strahlung und Dehydratation. Die Epidermis nimmt hier eine Schutzfunktion ein. Nach mechanischer Beeinträchtigung steht die Regeneration, das heißt die Wundheilung, im Vordergrund. Zudem verhindert die Intaktheit der epidermalen Barriere das perkutane Eindringen von Pathogenen in den Organismus. Darüber hinaus ist bei Infektion die Kommunikation mit den Zellen der Immunabwehr sowie die Aktivierung des Immunsystems eine weitere Aufgabe der epidermalen Barriere.

Die Epidermis muss nicht nur auf Umwelteinflüsse reagieren, sondern unterliegt gleichzeitig einem ständigen Erneuerungsprozess. Die greifenden Regulationsmechanismen scheinen komplex miteinander verbunden zu sein – abschließend aufgedeckt werden konnten sie noch nicht. Um Teilaspekte der funktionellen epidermalen Barriere zu betrachten, sind Kenntnisse über ihre Struktur unabdingbar [74].

1.4.1 Der Aufbau der Epidermis

Bei dem Organ Epidermis handelt es sich um ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel. Die verschiedenen Schichten werden von Keratinozyten gebildet, die durch einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad das jeweilige *Stratum* (*Str.*) der Epidermis markieren. Die Morphologie der Keratinozyten unterscheidet sich in Abhängigkeit von dem Stadium, in dem sich die Zellen während des komplex regulierten Differenzierungsprozesses hin zu Korneozyten befinden. Eingebettet in eine extrazelluläre Matrix sind die Keratinozyten miteinander verbunden [63]. Aufsteigend von basal nach apikal werden die Schichten als *Str. basale*, *Str. spinosum*, *Str. granulosum*, *Str. lucidum* (lediglich an Lokalisationen mit dünner Oberhaut vorkommend) und *Str. corneum* bezeichnet. Das Vorkommen von einigen Strukturproteinen ist schichtspezifisch, so dass sie als Marker für das entsprechende Stadium der Keratinozyten im Differenzierungsprozess stehen, siehe **Abbildung 4**. Der Differenzierungsprozess eines basalen Keratinozyten bis zur Abschilferung an der äußersten Schicht der Epidermis nimmt in etwa 4 Wochen in Anspruch [74].

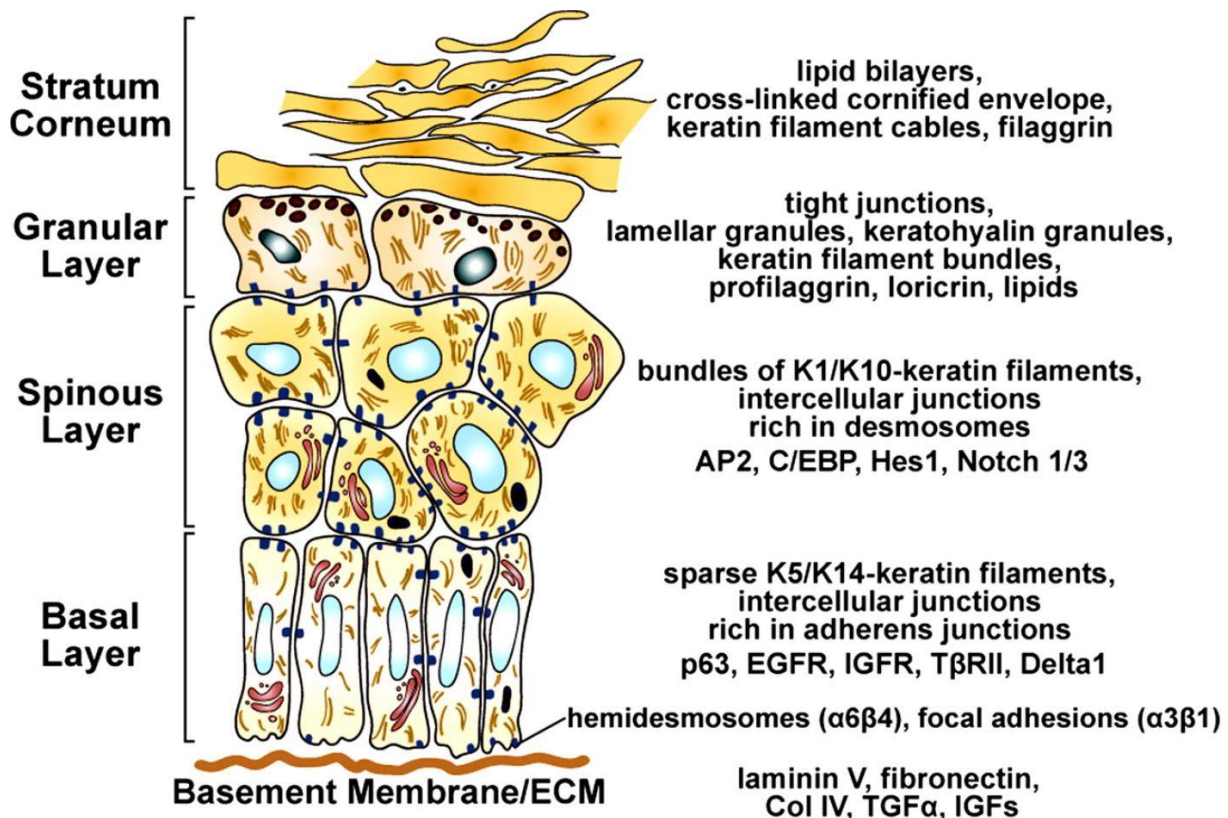


Abbildung 4. Schematische Darstellung des Aufbaus der Epidermis. Mit der Basalmembran verbunden ist die basale Zellschicht, das *Str. basale* (K5, K14 [75, 76]). Von basal nach apikal folgen *Str. spinosum* (K1, K10, IVL [77]), *Str. granulosum* (LOR [78]) und *Str. corneum* (FLG [79, 80]). Entsprechend der jeweiligen Differenzierungsstadien finden sich rechtsseitig charakteristische Strukturmarker. Diese Abbildung ist die Figure 1 aus Fuchs 2008, Referenz 81.

1.4.1.1 Keratinozyten – der dominierende Zelltyp der Epidermis

Keratinozyten (syn.: hornbildende Zellen) sind die häufigsten Zellen der Epidermis. Die Namensgebung beruht auf dem Intermediärfilament Keratin, das über 50% der Proteinmasse der Zellen ausmacht [82]. Keratinozyten steigen im Verlauf der Differenzierung von der Basalmembran in die obersten Schichten der Epidermis auf. Der Differenzierungsprozess geht mit einer plastischen Veränderung der Zellen einher [82]. Durch den Verhornungsprozess liegen sie dann als Korneozyten (syn.: Hornzellen) vor. Die Keratinozyten der epidermalen Barriere lassen sich nicht auf eine reine Funktion als „räumliche Grenze“ reduzieren, sie fungieren ebenfalls als Teilkomponente der Immunabwehr. Einerseits werden sie dieser Rolle durch die Produktion antimikrobieller Peptide gerecht [83], auf der anderen Seite sind sie über die Expression von *Toll-like receptor* (TLR) und anderer *pattern recognition receptors* (PRRs) an der Identifikation von Pathogenen und endogenen Signalen, wie beispielsweise zellulärem Stress, Verletzung, Inflammation und nekrotischem Zelltod, beteiligt [84, 85]. PRRs reagieren auf *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) mit der Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren, die über ihre Funktionen letztendlich die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten verstärken [86].

1.4.1.2 Str. basale

An die Basalmembran angeheftet befinden sich die Keratinozyten des *Str. basale*. Die Bindung besteht über Haftstrukturen, in denen Integrine als extrazelluläre Ankerproteine von zentraler Bedeutung sind. Zu nennen sind hier Hemidesmosomen ($\alpha 6 \beta 4$) und fokale Adhäsionen ($\alpha 3 \beta 1$). Die Keratine K5 und K14 sind spezifisch für das *Str. basale*, jedoch eher spärlich vorhanden. Zell-zu-Zell-Verbindungen bestehen über Adherens junctions sowie Desmosomen [81].

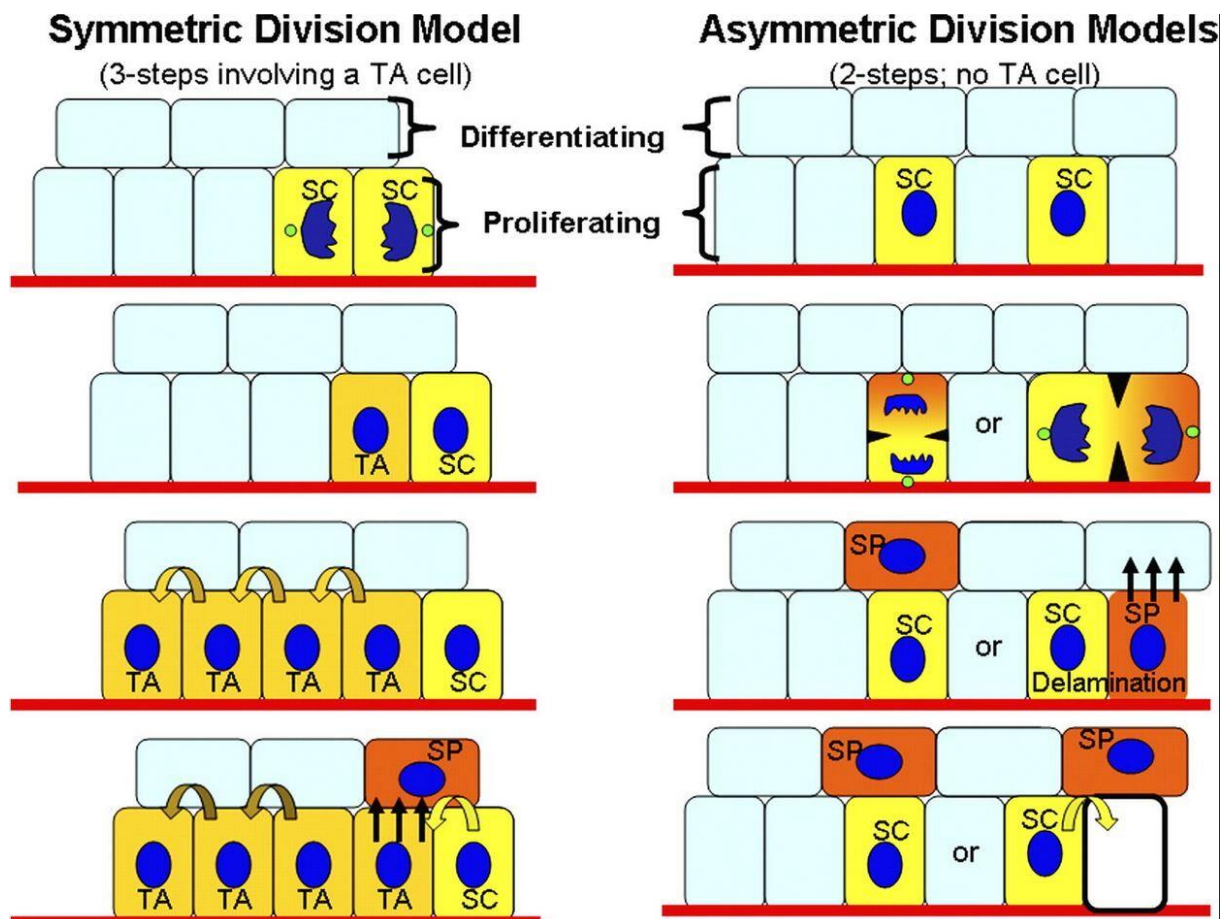


Abbildung 5. Modell zur Regeneration der Epidermis durch Zellteilung. Die zur Zellteilung befähigten Stammzellen sind an die Basalmembran angeheftet. Die Modellvorstellung einer symmetrischen Zellteilung geht von zwei Stammzellen als Ergebnis der Teilung aus. Eine der Zellen erwirbt eine transitorische Aktivität für weitere Zellteilungen, bevor sie sich von der Basalmembran ablöst und damit in die terminale Differenzierung eintritt. Die Hypothese einer asymmetrischen Zellteilung geht von der Entstehung zweier Tochterzellen mit unterschiedlichem Schicksal aus. Während eine Zelle zur Proliferation basal verbleibt, tritt die andere Zelle entsprechend eines relativ hohen Gehalts an Differenzierung-induzierenden Faktoren in den terminalen Differenzierungsprozess ein. SC: *Str. corneum*, SP: *Str. spinosum*, TA: *transit-amplifying*, Zellen mit transitorischer Teilungsaktivität. Diese Abbildung ist die Figure 2 aus Fuchs 2008, Referenz 81.

Besonders ist den basal lokalisierten Stammzellen die Eigenschaft selbst-erhaltend zu wachsen und gleichzeitig in den Zellen die Differenzierung zu initiieren, siehe **Abbildung 5**. Die basalen Zellen sind jeweils zu zehnt in einer so genannten *epidermal proliferative unit* (EPU) organisiert. Es konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden, ob allen basalen Zellen oder nur einem Teil die Funktion als Stammzelle zuzuschreiben ist [74]. Konform mit der Annahme einer symmetrischen mitotischen Zellteilung wäre die Annahme, dass innerhalb einer EPU lediglich eine einzelne Stammzelle existiert, während andere Zellen nach mehrfacher Teilung in den Differenzierungsprozess eintreten [81]. Dem gegenüber steht die Hypothese, dass einzelne Stammzellen die Mitose asymmetrisch durchlaufen [87].

1.4.1.3 *Str. spinosum*

Das *Str. spinosum* wird von Keratinozyten gebildet, die sich in einem relativ frühen Stadium des Differenzierungsprozesses befinden. Kennzeichnend ist, dass das Zytoskelett der Keratinozyten allmählich eine Art Rahmen bildet, der den Zellen Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung verschafft [63]. Untereinander bestehen weiterhin interzelluläre Verbindungen über Desmosomen, an diesen sind die Intermediärfilamente Keratine K1 und K10 beteiligt, die in den Keratinozyten des *Str. spinosum* zunehmend exprimiert werden [76, 88].

Die namensgebende „stachelige“ Morphologie der Zellen ist durch Artefakte beim Aufbereitungsprozess bedingt. Als Markerprotein des *Str. spinosum* gilt Involucrin (IVL).

1.4.1.3.1 Involucrin

IVL (68kDa) wird erstmalig in den suprabasalen Schichten des mehrschichtig-verhornenden Plattenepithels der Epidermis als ungebundenes Vorläufer-Protein exprimiert und gilt als früher Marker der terminalen Differenzierung [89, 90]. Ein Fortbestehen des Strukturproteins bis in die devitalen Korneozyten ist beschrieben [91]. Im späteren Verlauf der epidermalen Differenzierung lagert sich IVL mit anderen Strukturproteinen wie Envoplakin und Periplakin an die innere Seite der Plasmamembran der Keratinozyten an und bildet einen Teil des Proteinkomplexes, der als *cornified envelope* (CE) bezeichnet wird und wie ein Gerüst die Zelle stützt [92]. Die Modifizierung des Proteins sowie die kovalente Bindung an den CE werden durch die Transglutaminase 1 katalysiert [89]. Begünstigt wird die Einbettung des IVL über zahlreiche Quervernetzungen durch seine Proteinstruktur. Glutamin- und Lysin-reiche Regionen des IVL ermöglichen die Entstehung von Querverbindungen zu anderen Proteinen des CE (Desmoplakin, Keratin, Lysine) sowie die Ausbildung intramolekularer Brücken [93].

Die Expression von IVL zeigt sich von der Differenzierung abhängig [89]. Ein Teil der Promoterregion wird im humanen Genom als *distal regulatory region* (DRR) bezeichnet. Für die DRR wurden Bindestellen für zwei Transkriptionsfaktoren mit unterschiedlich starker regulatorischer Aktivität identifiziert: *activator protein-1* (AP-1) und *specificity protein 1* (Sp1) [91]. Die Aktivierung der Promoterregion durch AP-1 ist dabei unbedingt erforderlich und verfügt über einen eher starken Effekt [90]. Sp1 ist für die Aktivierung weniger essentiell, es muss kein stabiler Komplex der Transkriptionsfaktoren vorliegen. Sp1 treibt die Aktivierung

weiter voran, indem die Bindung von AP-1 optimiert wird. Der positiv synergistische Effekt wird eventuell über eine Konformationsänderung in der DNS bewirkt [90, 91].

1.4.1.4 *Str. granulosum*

Im fortgeschrittenen Differenzierungsprozess, dem die Keratinozyten des *Str. granulosum* zugehörig sind, kommt es zur Etablierung des CE unterhalb der Zellmembran. In diesem Stadium exprimieren die Keratinozyten Vorläufer-Proteine des CE, die in den Granula gespeichert werden [63, 94]. Die Granula werden in F- und L-Granula unterschieden, die (Pro-) Filaggrin bzw. Loricrin (LOR) beinhalten [95]. Diese Proteine sind reich an den Aminosäuren Glutamin und Lysin. Unter Einfluss von Calcium permeabilisiert die Zellmembran, in Folge werden Transglutaminasen aktiviert. Diese generieren γ -Glutamyl- ϵ -Lysin Quervernetzungen, um das proteinhaltige Gerüst der Keratin-Makrofibrillen zu synthetisieren [94]. Die Granula enthalten zudem diverse Protein-prozessierende Enzyme. Zu diesen Enzymen gehören Kallikreine (Serinproteasen) und Cathepsine (Endoproteasen) [96, 97]. Auch antimikrobielle Peptide wie β -Defensine lassen sich in den Vesikeln nachweisen [98]. Neben den Enzymen der Protein-Verarbeitung sind auch solche vesikulär gespeichert, die für die Lipid-Prozessierung wichtig sind [96, 97].

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Produktion von Pro-Filaggrin, das bis zur weiteren Prozessierung (= posttranslationale Modifikation) in den Granula gespeichert wird [94]. Markerprotein der relativ späten Differenzierung ist das Strukturprotein LOR.

1.4.1.4.1 Loricrin

LOR (25 kDa) ist eines der zentralen Proteine im CE der enddifferenzierten Keratinozyten und stellt den Hauptanteil der Proteinmasse des CE [78, 99–101]. Es gilt als spezifisch für das *Str. granulosum*, kann jedoch auch in den unteren Zellen des *Str. corneum* nachgewiesen werden [13, 102].

LOR ist stark Glycin-, Serin- und Cystein-haltig und in der Proteinstruktur immer wieder durchsetzt mit Glutamin- und Glutamin-Lysin-reichen Peptidabschnitten [92, 99]. In diesen Bereichen können durch N^ε- γ -glutamyl- ϵ -Lysin-Isopeptidbindungen Quervernetzungen entstehen. Auch über Disulfidbrücken bestehen Verbindungen inter- und intramolekular [99]. Die Entstehung der Verbindungen wird durch Transglutaminasen katalysiert [78]. LOR liegt daher kaum als Monomer vor, sondern eingebettet in einen Proteinkomplex. Die Querverbindungen tragen entscheidend dazu bei, dass LOR in seiner quervernetzten Struktur sehr stabil und kaum löslich erscheint [99], siehe **Abbildung 7**.

Da LOR ausschließlich im späten Stadium des Differenzierungsprozesses exprimiert wird, liegt ein Zusammenhang zwischen der Regulation der Gentranskription für LOR und dem Differenzierungsprozess nahe.

Die Regulation der LOR-Expression wird durch ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher kompetitiver und kooperativer Transkriptionsfaktoren bewirkt [103]. Untersuchungen wurden zunächst in Tiermodellen durchgeführt. Dort konnten im murinen Genom Bindungselemente

für die Co-Faktoren Sp1 und c-Fos in der proximalen Promoterregion des LOR-Gens identifiziert werden [13, 104]. Analog wirken in humanen Keratinozyten Sp1 und c-Jun (Teil des AP-1-Proteinkomplexes) positiv regulatorisch [103]. Gemeinsam mit einem noch nicht identifizierten Regulator und den Co-Aktivatoren p300 und CREB ergibt sich ein synergistischer Effekt des Transkriptionsfaktor-Komplexes für die Heraufregulation der LOR-Expression [103]. Verminderte Aktivität des LOR-Promoters kann ebenfalls Effekt verschiedener Transkriptionsfaktoren sein, u.a. zählen Sp3, Jun-B und *AP-2-like protein* zu den negativen Regulatoren [103].

Eine Abhängigkeit der zentralen Transkriptionsfaktoren vom jeweiligen Kompartiment wurde beschrieben [103].

1.4.1.5 *Str. corneum*

Der letzte Schritt der terminalen Differenzierung ist die Zerstörung der Zellorganellen, inklusive des Zellkerns. Nach Extrusion von Lipiddoppelschichten sind die devitalen Korneozyten eingebettet in die Matrix des CE [94]. Die Korneozyten bestehen in erster Linie aus einem Komplex aggregierter Intermediärfilamente (Keratine) und Filaggrin, umgeben vom CE [99], siehe **Abbildung 6**. Am Ende des Differenzierungsprozesses kommt es zur Desquamation der abgestorbenen Zellen [94].

Wichtig für die Integrität und Rigidität der epidermalen Barriere sind die Zell-Zell-Verbindungen zwischen den Keratinozyten des *Str. granulosum* und den Korneozyten. Die Desmosomen werden hier als Corneodesmosomen bezeichnet [105, 106].

1.4.1.5.1 Filaggrin

Filaggrin (*filament aggregating protein*, FLG) nimmt spät in der Differenzierungsphase der Keratinozyten als Strukturprotein in der Synthese des CE eine Schlüsselrolle ein. FLG geht aus einem >300kDa großen Vorläuferprotein hervor; hierbei handelt es sich um das schwer lösliche Phosphoprotein Pro-FLG [107–109]. Synthetisiert wird Pro-FLG vor allem im *Str. granulosum*, wo es in F-Granula (zytoplasmatische, nicht-membrangebundene unlösliche Keratohyalin-FLG-Granula) gespeichert und posttranslational modifiziert wird [95, 110]. Das Polypeptid wird während der Differenzierung vollständig prozessiert. Es entstehen mehrere FLG-Monomere und ein Calcium-bindendes NH₂-terminales FLG S-100 Protein, das auch als FLG-2 bezeichnet wird [111]. Dieses Protein wird nach der Prozessierung in den Nukleus transloziert, so dass eine Funktion als Calcium-abhängiger Transkriptionsfaktor für die Gene der Keratinozyten-Differenzierung angenommen wird [109, 112]. Die S100-Proteine sind allgemein Regulatoren der epidermalen Homöostase und weisen bei verändertem Expressionslevel auf epidermalen Stress hin. Interessanterweise konnte unter Stimulation mit IL-22 eine erhöhte Genexpression von S100A8 und S100A9 beobachtet werden [113]. Die genaue Funktion des FLG-2-Proteins konnte jedoch noch nicht aufgedeckt werden [111]. Die Expression von FLG kann durch Induktion der Differenzierung mittels Calcium getriggert werden [114].

An der Prozessierung des Pro-FLG sind diverse Enzyme beteiligt, wobei noch nicht alle Aspekte der posttranslationalen Verarbeitung erforscht sind. Bekannt ist eine Beteiligung von Mitgliedern der Proprotein Konvertase-Familie (z.B. Furin) sowie von Calcium-abhängigen nicht-lysosomalen Cysteinproteasen (z.B. Calpain-1) und Serinproteasen (Profilaggrin Endopeptidase 1 = PEP1 und Matriptase/MT-Sp1) [115, 116]. Das nicht-prozessierte Pro-FLG ist wie bereits erwähnt schwer löslich, diese Eigenschaft verkompliziert die Analyse von Pro-FLG *in vitro* [115].

Entscheidend für die Enzymfunktion ist die Aufrechterhaltung des entsprechenden pH-Optimums. Die enzymatische Aktivität zeigt sich reduziert, wenn es zum Anstieg des pH-Wertes kommt, wie es im Fall einer beeinträchtigten epidermalen Barriere der Fall ist. In der Konsequenz wird Pro-FLG nur noch unvollständig prozessiert, es liegen FLG Di- und Trimere vor. Weiterhin kommen die F-Granula noch in relativ hohen Schichten des *Str. corneum* vor [117].

Verschiedene Funktionen tragen ebenfalls zu der hohen Bedeutung bei, die FLG im Differenzierungsprozess zukommt. Zum einen aggregiert FLG die Keratine K1 und K10 zu makrofibrillären Bündeln, so dass es zur Umwandlung des Zytoskeletts der Korneozyten kommt. Es entstehen die devitalen Korneozyten der obersten Hautschichten [114]. In den entstehenden Korneozyten machen die FLG-Monomere bis zu 10% der quervernetzten CE-Proteine aus [118, 119]. Dieser Prozess ist Teil der Entstehung der epidermalen Barriere, die u.a. durch die quervernetzten Korneozyten eine effektive Barriere der Haut zur Umwelt bildet [114]. Dazu trägt außerdem der vollständige Abbau der FLG-Monomere zu wasseranziehenden Aminosäuren bei, aus denen sich *natural moisturizing factors* (NMF) ableiten. So wird die Hydratation der Epidermis unterstützt [120, 121]. Das Abbauprodukt Urocaninsäure ist zudem an der Aufrechterhaltung des relativen sauren pH-Wertes im *Str. corneum* beteiligt und trägt somit zur regelrechten enzymatischen Aktivität der Lipid-modifizierenden Enzyme des extrazellulären Raumes (EZR) sowie der Proteasen zur FLG-Prozessierung bei [117].

Ist die Expression von FLG bzw. die Prozessierung von Pro-FLG gestört, kommt es zum Defekt der epidermalen Barriere. Auswirkungen betreffen sowohl die Morphogenese des CE als auch die Formation der Lipid-Matrix im extrazellulären Raum des *Str. corneum* sowie die Desquamation [115, 117]. Die Beeinträchtigung der FLG-Expression ist für verschiedene chronisch-entzündliche Hautkrankheiten relevant und wird in **Kapitel 1.5** detaillierter beschrieben. Signalwege der FLG-Regulation sind aktueller Forschungsgegenstand.

Untersucht wurde bereits der Einfluss inflammatorischer Zytokine auf die FLG-Expression: Unter Einfluss der Th2-spezifischen Zytokine IL-4 und IL-13 differenzierte Keratinozyten weisen deutlich reduzierte FLG-Level auf, die auf eine Herunterregulation durch die Zytokine zurückzuführen sind [114]. Eine Herunterregulation der FLG-Expression ist auch für Th1/Th17-assoziierte Zytokine wie IL-17 und IL-22 beschrieben [113, 121]. Auch TNF α reduziert die Expression von FLG [114, 122]. Neben einem direkten Effekt auf die Genexpression ist ebenfalls ein indirekter Einfluss der Zytokine, speziell von IL-17, auf das FLG-Level beschrieben. Durch Herauf- besonders aber auch Herunterregulation

proteolytischer Enzyme ist die Prozessierung beeinträchtigt. Unter einer Stimulation mit IFN- γ ist die Expression von FLG hingegen verstärkt [114].

1.4.2 Die epidermale Barriere

Der Begriff „epidermale Barriere“ bezieht sich auf die obersten Schichten der Epidermis. Um den physiologischen Zustand beurteilen zu können, ist es jedoch wichtig, die Epidermis als Gesamtkonstrukt zu betrachten, da die Intaktheit der Barriere durch alle Komponenten der Epidermis gewährleistet wird. Auf struktureller Ebene tragen in erster Linie drei Komponenten zur Integrität der epidermalen Barriere bei [63, 123]:

1. die Korneozyten des CE, im Speziellen die zytoskelettalen Elemente,
2. zahlreiche Zell-Zell-Verbindungen der oberen Zellschichten wie *tight junctions* und Corneodesmosomen,
3. die Lipidzusammensetzung des interzellulären Raumes.

Die epidermale Barriere übernimmt einen funktionellen Schutz vor verschiedenen Belastungen und Beeinträchtigungen. Neben der physikalischen Barriere, die durch das *Str. corneum* aufrechterhalten wird [124], wirkt die Barriere ebenfalls auf (bio-)chemischer Ebene antimikrobiell im Sinne der angeborenen Immunabwehr. Wichtig hierfür sind Lipide, Säuren, Enzyme, antimikrobielle Peptide und Makrophagen. Als protektiv ist zudem die Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem zu betrachten, die sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten betrifft [123].

Die Integrität der epidermalen Barriere beruht auf einem komplexen Zusammenspiel von Strukturproteinen, Quervernetzungen sowie einer Lipidzusammensetzung und -organisation. Die einzelnen Bestandteile für eine effektive Barrierefunktion bedingen sich teilweise gegenseitig: So führen beispielsweise sowohl der Verlust von FLG als auch die Schädigung von *tight junctions* zu Veränderungen des pH-Werts im *Str. corneum*. In Folge kommt es zur Beeinträchtigung enzymatischer Prozesse wie etwa der Lipidverarbeitung, aber wiederum auch der Prozessierung von FLG [117, 125].

1.4.2.1 Strukturen der epidermalen Barriere: der cornified envelope

Die epidermale Barriere besteht aus enddifferenzierten Keratinozyten, den sogenannten Korneozyten [126]. Am Ende eines komplexen Differenzierungsprozesses zum Korneozyten liegen die Zellkörper kernlos und frei von anderen Organellen vor. Das Endprodukt der terminalen Differenzierung der Keratinozyten besteht aus einer Keratin-Filament-Matrix, umgeben von einem stabilen Protein- und Lipidgerüst. Dieses Gerüst ersetzt die Plasmamembran der Zellen und wird *cornified envelope* (CE) genannt [118]. Der CE entsteht an der Außenseite der Korneozyten unterhalb der Plasmamembran und setzt sich aus einer inneren Proteinhülle und einer äußeren Lipidhülle zusammen [124]. Auf diese Weise entsteht eine monomolekulare Schicht hydrophober Lipide (insbesondere Ceramide), die kovalent an die äußere Seite des CE gebunden ist [127, 128].

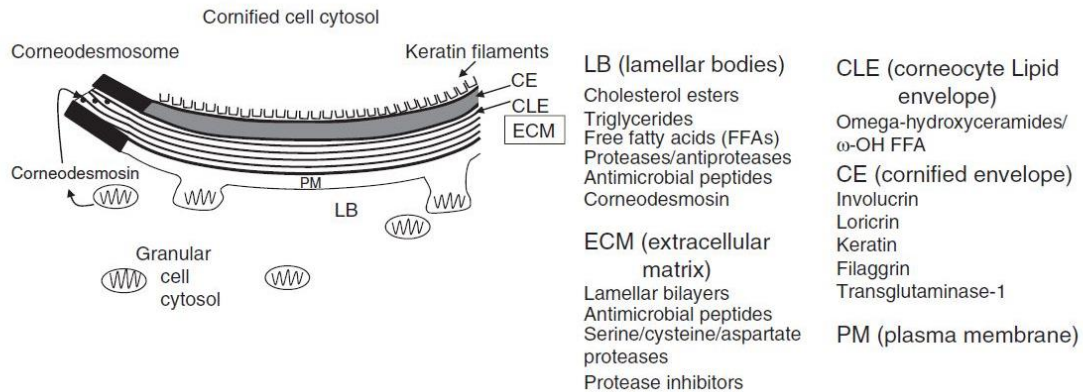


Abbildung 6. Schematische Struktur der epidermalen Barriere. Die Keratinfilamente der Korneozyten sind an die Proteine des CE gebunden. Der CE wird von einer Lipidhülle umgeben, dem *corneocyte lipid envelope* (Korneozyten-Lipidhülle, CLE). Eingebettet sind die umhüllenden Strukturen aus Proteinen und Lipiden in eine extrazelluläre Matrix. LB: lamelläre Granula, ECM: extrazelluläre Matrix. Diese Abbildung ist die Figure 1 aus Elias 2012, Referenz 129.

Das komplexe Differenzierungsprogramm der Keratinozyten ist durch die Expression Differenzierungs-assoziiierter Proteine gekennzeichnet [130]. Durch Quervernetzungen bilden diese Proteine der Keratinozyten die innere Hülle des CE. Zu den zentralen Proteinen zählen u.a. LOR, IVL, *SPR proteins*, Envoplakin, Cystatin A, Keratolinin sowie Trichohyalin [93, 99, 110, 118, 131, 132]. Weitere Strukturproteine des Zytoskeletts, die Keratine, werden durch verschiedene Transglutaminasen vernetzt und an Proteine des CE gebunden. Die Resilienz des CE ist in dieser Quervernetzung begründet, die über N^{ϵ} - γ -glutamyl- ϵ -Lysin-Isopeptidbindungen erfolgt und durch Disulfidbrücken verstärkt wird [77, 133]. Die Zusammensetzung der Strukturproteine ist während des Entstehungsprozesses nicht konstant, sondern unterliegt im Zeitverlauf einer Modifikation. In Abhängigkeit von der Lokalisation der Epidermis variiert somit die Zusammensetzung der Strukturproteine des CE [81, 92, 119, 124].

Neben den Proteinbestandteilen des CE trägt zusätzlich eine aus Lipiden bestehende Hülle zur funktionellen epidermalen Barriere bei [81, 92]. Ceramid A und Ceramid B werden kovalent an den CE gebunden, bevorzugt an IVL, und binden nachfolgend freie Fettsäuren, freie Ceramide und Cholesterin [124]. Die Bindung der Proteine erfolgt über N^{ϵ} - γ -glutamyl- ϵ -Lysin-Isopeptidbindungen [115]. Es resultiert ein „Lipidmantel“, der sich außen an die Proteinhülle anlagert, siehe **Abbildung 6** und **Abbildung 7**.

Viele der Gene, die mit dem terminalen Differenzierungsprozess der Keratinozyten assoziiert sind, befinden sich im *epidermal differentiation complex* des PSORS4 Locus auf Chromosom 1q21. Sie werden anhand ihrer Funktion in drei weitere Gruppen unterteilt:

- Vorläuferproteine des CE: IVL, LOR, SPRP, LCE,
- Keratinfilament-bindende Proteine: FLG, Trichohyalin, Hornerin, u.a.,
- Ca^{2+} -bindende S100-Proteine [134].

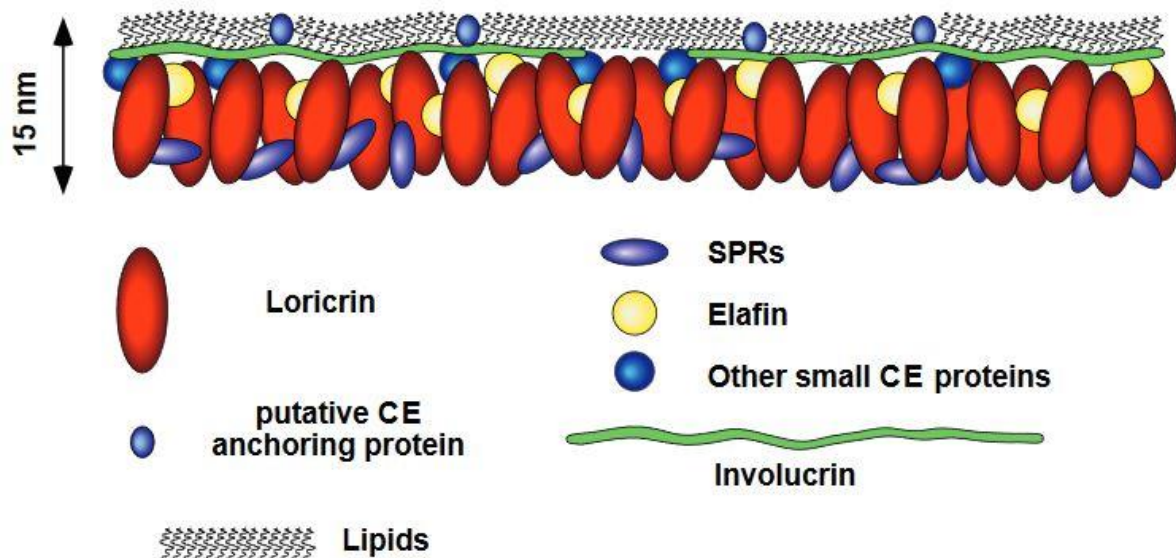


Abbildung 7. Schema des CE. Loricrin-Moleküle machen den Hauptbestandteil der Proteinmasse aus, eine im weitesten Sinne parallele Anordnung wird angenommen. SPR Proteine schaffen weitere Querverbindungen zwischen den Proteinen. Für IVL wird eine längliche Struktur angenommen, die die Verankerung der Lipide an das Proteingerüst ermöglicht. Diese Abbildung ist die Figure 6 aus Jarnik 1998, Referenz 119.

1.4.2.2 Keratinisierung: Der p63 / IKK- α Signalweg als intrazellulärer Regulationsmechanismus

Von zentraler Bedeutung für die regelrechte Ausgestaltung des CE ist das Vorhandensein von Korneozyten. Diese sind das Produkt der Keratinisierung, für die wiederum das Strukturprotein FLG essentiell ist. FLG aggregiert Keratin-Filamente in Bündeln zu Makrofibrillen. In diesen quervernetzenden Makrofibrillen sind die Keratine kondensiert und geordnet. Gemeinsam machen FLG und Keratine 80-90% der Proteinmasse der Epidermis aus [135].

Unter Keratinisierung versteht man den programmierten Zelltod, den die Keratinozyten bis zur Bildung des *Str. corneum* durchlaufen [113]. Die Keratinisierung umschreibt den Differenzierungsprozess.

Ein regelrechter Ablauf der Differenzierung ist von entscheidender Bedeutung in der Homöostase zwischen Proliferation, Migration und Differenzierung der Keratinozyten. An diesem Prozess sind viele verschiedene Faktoren regulierend beteiligt [136–138]:

- Adhäsionsverbindungen: Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte [74],
- Calcium-Konzentration [13, 139],
- Membran-Rezeptoren: HER [140, 141],
- Liganden der Membran-Rezeptoren: EGF, Hereguline [142, 143],
- Intrazelluläre Signalproteine: Proteinkinase C, *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), NF- κ B, Notch [144–148].

Unter den intrazellulären Signalwegen zur Regulation der Balance zwischen Differenzierung und Proliferation auf transkriptioneller Ebene soll im Folgenden die Bedeutung des p63/IKK- α Signalwegs hervorgehoben werden. Dem Protoonkogen p63 kommt in der Regulation des Differenzierungsprozesses besondere Bedeutung zu.

Beschrieben wurden für den Transkriptionsfaktor p63 zwei verschiedene Effekte. Einerseits scheint p63 den Transkriptionsfaktor p53 zu inhibieren. p53, das als eines der wichtigsten Tumorsuppressor-Gene gilt, wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es durch die Unterbrechung des Zellzyklus die Proliferation potentiell entarteter Zellen beendet. Jenseits dieser Funktion ergibt sich eine weitere Wirkungsweise von p63, die als unabhängig von p53 gilt. So wurde beschrieben, dass der Wechsel von Proliferation zu Differenzierung unabhängig von p53 durch Δ Np63 induziert wird [149, 150]. In Folge des Ablösens von der Basalmembran wird der Transkriptionsfaktor p63 herunterreguliert, so dass eine spezielle Bedeutung des Transkriptionsfaktors in Bezug auf den Übergang der basalen Keratinozyten zum *Str. spinosum* angenommen wird. Entsprechend wird Δ Np63 eine Rolle bei der Erhaltung des Proliferationspotentials zugesprochen [151].

Durch die unter **1.3.1.1** beschriebene Interaktion von p63-Isoformen mit GATA-3 stellt sich hier die Frage nach der Bedeutung des in den Keratinozyten noch relativ unbekannten Transkriptionsfaktors.

1.5 Chronisch-entzündliche Hautkrankheiten

Viele chronisch-entzündliche Hauterkrankungen gehen mit einer gestörten epidermalen Barriere einher. Durch Defekte der epidermalen Barriere kommt es zur Stimulation der Keratinozyten, in deren Folge die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren des Immunzell-Rekrutments steht [152]. Ursachen und Pathomechanismen für diese relativ häufigen Krankheitsbilder sind folglich von großem Interesse, jedoch derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Insbesondere in Hinblick auf die Optimierung therapeutischer Optionen gilt es potentielle Zielstrukturen aufzudecken [60].

1.5.1 Atopische Dermatitis

1.5.1.1 Epidemiologie

Die atopische Dermatitis (syn.: atopisches Ekzem/endogenes Ekzem/Neurodermitis) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Haut, zu deren Erstmanifestation es häufig zwischen dem 3. und 6. Lebensmonat kommt [153]. Die Lebenszeitprävalenz wird für (Klein-)Kinder mit 10-20% angegeben, bei Erwachsenen liegt sie laut Literatur zwischen 1-3% [154].

1.5.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der atopischen Dermatitis (AD) konnte noch nicht vollständig aufgedeckt werden. Neben einer polygenen Vererbung sind endogene sowie exogene Trigger bekannt. In der Literatur wird angegeben, dass bei bis zu einem Drittel der Patienten eine Mutation im FLG-Genabschnitt besteht [155–157]. Es sind zahlreiche weitere Mutationen bekannt, die mit dem Erkrankungsbild der AD assoziiert sind. Zu den häufigeren bekannten Mutationen des FLG-Gens zählen 2282del4 und R501X, wobei die heterozygote Mutation nicht zur kompletten Aufhebung der FLG-Expression führt [157].

1.5.1.3 Klinik der atopischen Dermatitis

Der klinische Verlauf ist in seiner Chronizität häufig durch ein Wechselspiel von Remission und Rezidiven geprägt. Die betroffenen Hautpartien zeigen eine charakteristische Morphologie. Es demonstrieren sich eine papulovesikulöse Rötung, gepaart mit Crustae, Hyperpigmentierung sowie (serösem) Nässen und Erosionen. Insgesamt imponiert die nicht-läsionale Haut eher als trocken [154]. Verkomplizierend kommt es häufig zu bakteriellen und viralen Superinfektionen der Läsionen. Besonders häufig sind bakterielle Infektionen mit *Staphylococcus aureus*, respektive die Manifestation eines Ekzema herpeticatum durch Herpes simplex Typ 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) [154, 158, 159]. Zudem können an atopischer Dermatitis Erkrankte durch weitere Stigmata wie einer Dennie-Morgan-Falte, Glanznägeln oder das Hertoghe-Zeichen gekennzeichnet sein [160].

Die charakteristischen Prädilektionsstellen der Effloreszenzen stehen in Abhängigkeit zum Alter der Patienten. Im Säuglingsalter sind primär Gesicht (Beginn mit Milchschorf [161]) und

Streckseiten der Extremitäten betroffen. Mit zunehmendem Alter sind die Effloreszenzen eher auf Seite der Flexoren lokalisiert [154].

Im Zentrum des Beschwerdebildes steht neben der läsionalen Haut der Pruritus, durch den es zu einer starken Beeinträchtigung des Alltags der Patienten kommen kann [153, 161–163].

Wichtig ist das Verständnis der atopischen Dermatitis als systemische Erkrankung. Die Phänotypisierung der Erkrankung kann beispielsweise anhand des IgE-Levels im Serum oder der Zellzählbestimmung von Eosinophilen in verschiedenen Sekreten erfolgen [164]. Bei der extrinsischen Form der atopischen Dermatitis mit erhöhten IgE-Levels besteht eine Prädisposition zu anderen atopischen Erkrankungen wie allergischem Asthma bronchiale [165]. Interessanterweise ist die Wahrscheinlichkeit an Asthma bronchiale und weiteren Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis zu erkranken bei AD-Patienten mit FLG-Mutation erhöht [157, 166, 167]. Bei einer systemisch-progredienten Erkrankung spricht man vom „*atopic march*“ [166].

1.5.1.4 Immunhistologie der atopischen Dermatitis

Die atopische Dermatitis ist eine Erkrankung, in deren Pathophysiologie die Dominanz der Th2-Zellen insbesondere zu Beginn von hoher Relevanz ist. Bei den Zellinfiltrationen zeigt sich eine Dominanz der aktivierten CD4⁺T-Gedächtniszellen [168, 169]. Allgemein zeigt sich eine Erhöhung der Ratio von CD4⁺/CD8⁺ -Zellen. Unterstützt wird dieser Trend zusätzlich durch ein generell erhöhtes Level von T-Zellen, das durch die chronische Stimulation sowie einen erhöhten Zellumsatz begründet ist [153]. Zu den hochregulierten Zelltypen gehören ebenfalls *T regulatory cells* (T_{reg}) und Th17-Zellen [170–173]. Die Zahl der in der Haut residenten T-Zellen ist erhöht. Typischerweise lässt sich in läsionaler Haut von AD-Patienten ein erhöhter pH-Wert nachweisen [174]. Reduzierte Lipid-Level mit abweichender Zusammensetzung [175, 176] sowie FLG-Defizienz [114, 157] sind bekannte Merkmale der atopischen Dermatitis [113]. Ist der Mangel an FLG durch Mutation bedingt, kommt es ebenfalls zur Reduktion der NMFs [177].

1.5.1.5 Pathophysiologie der atopischen Dermatitis

Zu Beginn der Entzündungsreaktion kommt es durch eine mechanische Irritation zur Störung der epidermalen Barriere, in deren Konsequenz werden proinflammatorische Zytokine hochreguliert. Die verstärkte Expression der entzündungsprovozierenden Zytokine IL-1 α , IL-1 β , TNF- α und GM-CSF aktiviert vaskuläre Endothelrezeptoren [178]. Es folgt die Induktion von Zell-Adhäsionsmolekülen des Endothels, so dass infiltrierende Zellen verstärkt in den extravasalen Raum transmigrieren können. Zu den potentiell möglichen Signalwegen nach Aktivierung des Endothelrezeptors gehört u.a. NF- κ B [179]. Entscheidend in der Inflammation ist folglich die Interaktion zwischen Gefäßendothel und Entzündungszellen (Leukozyten, aber auch Mastzellen und perivaskuläre Makrophagen) [153, 180–182].

Nach Infiltration in die Haut reagieren Leukozyten Kontext-abhängig. In akuten Läsionen dominieren aus Th-Zellen, Mastzellen und Basophilen freigesetzte Th2-assoziierte Zytokine das Milieu: Die Interleukine IL-4, IL-13, IL-31 und IL-5 werden verstärkt produziert und

sezerniert [169]. Besonders IL-4 wird für die initiale Inflammation als Ursache angesehen [183]. IL-4 bewirkt den IgE-Isotypenwechsel [184], unterstützt das Mastzell-Wachstum [185] und erleichtert die Migration von Monozyten und Eosinophilen in entzündetes Gewebe, speziell in läsionale Haut der AD [186, 187]. So hält es die entzündliche Reaktion aufrecht [186].

IL-4 wird größtenteils - aber nicht ausschließlich - durch reife Th2-Zellen produziert und sezerniert [35, 46, 188]. Wie bereits erläutert, ist die IL-4-Sekretion Teil einer Kaskade, die wiederum die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Zellen vorantreibt. Auch durch diesen selbstverstärkenden Prozess persistiert die Inflammation.

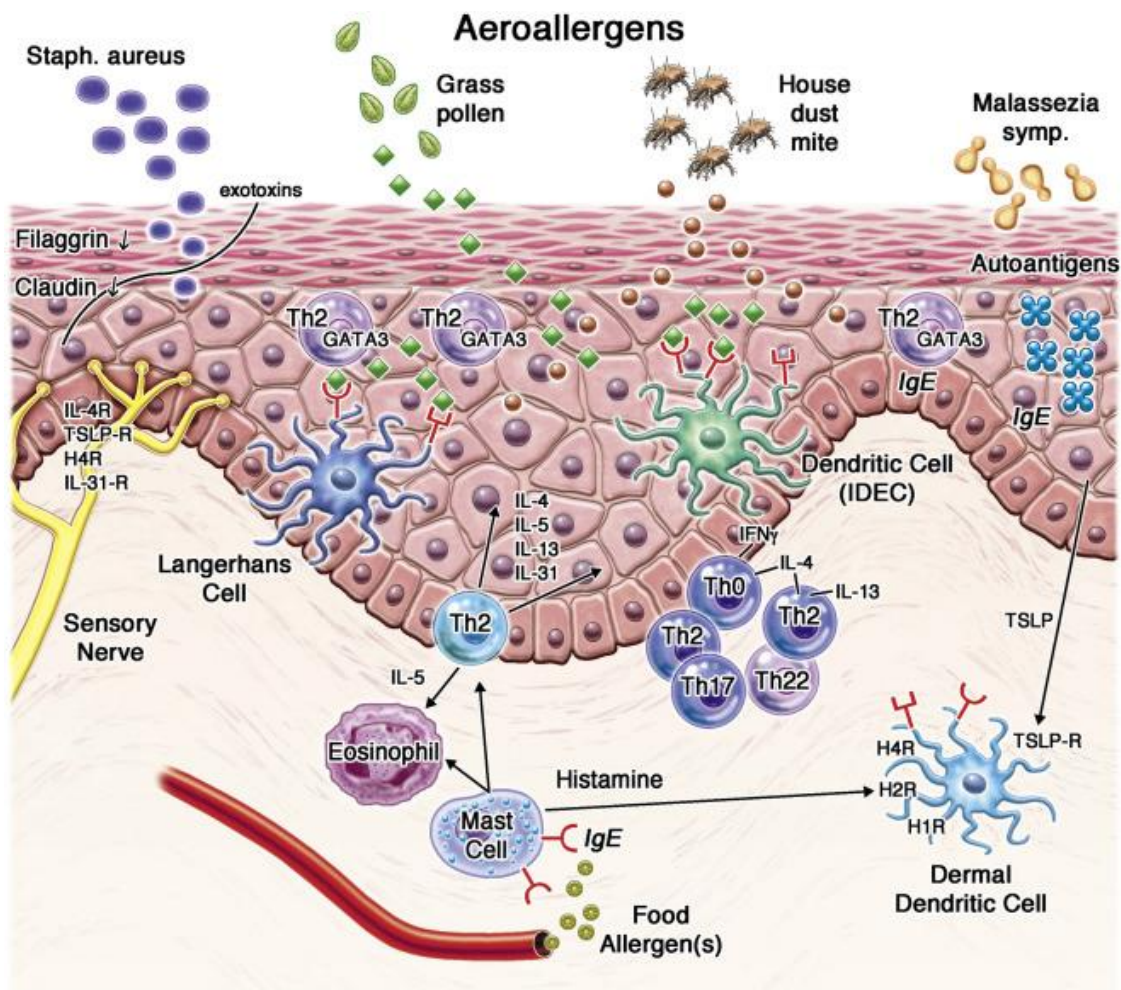


Abbildung 8. Pathophysiologie der atopischen Dermatitis. Beeinträchtigung der Haut durch verschiedene Pathogene führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die die Expression von Adhäsionsmolekülen im vaskulären Endothel induzieren. Die Extravasation von Entzündungszellen wird so begünstigt. Milieu-bedingt kommt es zur Polarisation naiver Th0-Zellen zu Th2-Zellen. In chronischen Läsionen steht die Infiltration von IDECs, Makrophagen und Eosinophilen im Vordergrund. Durch die von ihnen sezernierten Zytokine kommt es zum Isotypenwechsel zugunsten eines Th17-/Th22-assoziierten Zytokin-Milieus. TSLP: thymic stromal lymphopoietin, IDEC: inflammatorische dendritische Zelle, H4R: Histamin 4-Rezeptor. Diese Abbildung ist die Figure 1 aus Werfel 2016, Referenz 189.

Ein Effekt der Th2-Zytokine auf die negative Regulation der Genexpression von FLG, LOR und IVL ist beschrieben. Insbesondere läsionale Haut weist eine FLG-Defizienz auf, die nicht genetisch determiniert sein muss, sondern im Krankheitsverlauf erworben werden kann [123].

Neben der Polarisation zu Th2-Zellen sowie einem Einfluss auf die Genexpression zentraler Strukturproteine zeigt sich ein weiterer Effekt erhöhter IL-4 und IL-13 Level auf die Keratinozyten der Epidermis. Die epidermalen Zellen setzen unter diesen Konditionen vermehrt das inflammatorische CCL22 (*macrophage-derived chemokine*) frei, durch das CCR4⁺CD4⁺Th2-Zellen angelockt werden [190]. Zudem induziert IL-13 die Expression von MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9) in den Keratinozyten, einem Enzym, dass die Leukozyten-Migration begünstigt [191].

Auch in chronischen Läsionen ist die Anzahl der infiltrierenden Th-Zellen erhöht, wenn auch weniger stark als in der akuten Situation [169]. Es erfolgt ein Wechsel der dominierenden Zytokine im Verlauf von akuter zu chronischer Läsion. Große Bedeutung für die Änderung des Zytokinmilieus wird IL-12 zugesprochen, das aus infiltrierenden Eosinophilen und inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDECs) freigesetzt wird [153, 192, 193]. Bei IDECs handelt es sich neben Langerhans Zellen um eine der beiden dendritischen myeloischen Zellarten, die bei Patienten mit atopischer Dermatitis in läsionaler Haut nachgewiesen werden. Charakterisiert ist das Milieu im Folgenden durch Zytokine, die eine Polarisation zu Th1-Zellen, Th17-Zellen und Th22-Zellen bewirken. Zu diesen Zytokinen gehören u.a. IL-12, IL-17, IL-22, IL-23, IL-27 und IL-18, die aus *antigen-presenting cells* (APC) freigesetzt werden. Th1-polarisierte Zellen setzen vermehrt IFN- γ , GM-CSF und IL-12 frei [153, 194, 195].

Interessant ist ebenfalls das erhöhte Level des Chemokins CCL27 (*CC-chemokine ligand 27*) in läsionaler Haut, dem eine Bedeutung in der Chemotaxis von CLA⁺ Th-Zellen zugesprochen wird [196]. Der Oberflächenmarker *cutaneous lymphocyte antigen* (CLA) weist eine Gruppe von Th-Zellen aus, denen eine besondere Relevanz zu Beginn der Entzündungsreaktion während der Extravasation aus dem Gefäßsystem zukommt. CLA⁺-Zellen binden an E-Selectin, einem Adhäsionsmolekül, das im inflammatorischen Gewebe exprimiert wird, so dass er als *homing*-Rezeptor der Haut bezeichnet wird [197, 198].

Entscheidend an der immunologischen Reaktion beteiligt sind ebenfalls APCs der Epidermis, im Speziellen dendritische Zellen (DCs). Sie werden unterteilt in zwei Untergruppen, von denen die Zellen der einen aus Monozyten (*myeloid dendritic cells*, *mDCs*) hervorgehen, die anderen aus Vorläufern von B- und T-Lymphozyten, den plasmazytoiden dendritischen Zellen (*plasmacytoid dendritic cells*, *pDCs*). Eine weitere Unterteilung der mDCs erfolgt in Langerhans-Zellen (LCs) und IDECs. LCs sind beispielsweise über die Sekretion von IL-16 in ihrer Bedeutung für die Entzündungsreaktion nicht zu unterschätzen. Erhöhte Spiegel von IL-16 locken chemotaktisch CD4⁺ Th-Zellen an und halten so die akute Immunreaktion aufrecht [196]. Durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine tragen LCs zu Beginn der Immunantwort zur Differenzierung von naiven Th-Zellen zu Th2-Zellen bei [199].

Angenommen wird ebenfalls eine Bedeutung der DCs für den Isotypenwechsel von Antikörpern. IDECs produzieren Th1-assoziierte Zytokine wie IL-12 und IL-18 [199]. Sowohl LCs als auch IDECs tragen an der Oberfläche hoch-affine IgE-Rezeptoren, die die Antigen-Präsentation an T-Zellen vermitteln [153].

1.5.1.6 Die epidermale Barriere bei atopischer Dermatitis

Defekte in der epidermalen Barriere sind nicht nur für die Initiation der Entzündung ursächlich, sondern halten die Inflammation auch aufrecht [200]. Es kommt zur Chronifizierung der Erkrankung [201].

Charakteristischer Defekt bei AD-Patienten ist ein erhöhter pH-Wert in läsionaler Haut. Eine Dysregulation des pH-Wertes wirkt sich auf die Aktivität der epidermalen Enzyme zur Lipid- und Protein-Prozessierung aus [174, 202]. Auch reduzierte Lipid-Level sind ein typisches Merkmal der Haut von AD-Patienten [175, 176].

Nicht zuletzt ist die Integrität der epidermalen Barriere durch eine reduzierte FLG-Expression beeinträchtigt. Die FLG-Defizienz kann sowohl angeboren und genetisch verankert als auch erworben sein [114, 157]. Defekte in der epidermalen Barriere erhöhen die Penetrationsfähigkeit für Antigene. Konsekutiv kann es zu intensivierter Antigen-Präsentation mit verstärktem Priming von naiven Th-Zellen kommen, die mit multiplen Sensibilisierungen einhergehen können [203–205].

Neben FLG scheint auch FLG2 von hoher Bedeutung für die physiologische epidermale Barriere zu sein. Beschrieben ist eine Assoziation von FLG2-Defizienz mit Veränderungen im *Str. corneum* und Störungen der Verhornung, die mit einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion einhergehen [206].

1.5.2 Psoriasis vulgaris

Psoriasis (syn.: Schuppenflechte) ist eine chronisch-inflammatorische Hauterkrankung, die aus der fehlerhaften Interaktion von Keratinozyten und Immunzellen entsteht [124, 207]. Zunehmend wird die Psoriasis unter dem Aspekt der gestörten epidermalen Barriere betrachtet.

1.5.2.1 Epidemiologie der Psoriasis

Mit einem Anteil von 1-2% in der kaukasischen Bevölkerung gehört Psoriasis zu den häufigsten Erkrankungen der Haut, die durch eine Dysregulation des Immunsystems verursacht werden [208]. Bei anderen Ethnizitäten ist die Prävalenz sehr viel niedriger [209]. Es werden zwei Krankheitsverläufe anhand des Manifestationsalters unterschieden. Bei der mit etwa 60-70% häufigeren Erscheinungsform setzt der Krankheitsbeginn vor dem 40. Lebensjahr ein. Sie tritt familiär gehäuft auf und ist in der Regel durch einen schwereren Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Die seltenere Verlaufsform manifestiert sich erst jenseits des 40. Lebensjahres und zeigt einen milderen Verlauf der klinischen Symptomatik [210].

1.5.2.2 Ätiologie der Psoriasis

Sowohl eine genetische Prädisposition bei polygener Vererbung als auch Triggerfaktoren aus der Umwelt (infektiös, medikamentös, mechanisch) sind beschrieben. Bezüglich der genetischen Komponente in der Ätiologie sind bis dato etwa 40 Gene beschrieben, die die Suszeptibilität für Psoriasis erhöhen. Diese Gene sind in Bereiche mit unterschiedlicher Bedeutung einzuordnen. Dazu zählen antimikrobielle Effekte, die Th1-/Th17-basierte Immunabwehr sowie die epidermale Barrierefunktion in Bezug auf die Differenzierung der Keratinozyten. Speziell zu erwähnen sind aus diesen Bereichen das β -Defensin und das *late cornified envelope* Gencluster sowie Gene, die für Corneodesmosin kodieren [211–215]. Zu betonen ist die Assoziation der frühen Erscheinungsform zu bestimmten HLA-Typen (HLA-Cw6, HLA-B17 und HLA-B57) [216–220]. Kontrovers diskutiert wird die Bedeutung des *psoriasis susceptibility 1*-Gens (PSOR1) [208, 221].

1.5.2.3 Klinik der Psoriasis

Klinisch auffällig bei Betroffenen sind erhabene, erythematöse, derbe Plaques mit anhaftender silbriger Schuppung, die teilweise mit Pruritus einhergehen können [222]. Die Läsionen sind scharf umgrenzt [59]. Prädispositionsstellen sind Ellenbogen, Knie und Kopf [223]. Die Patienten können durch weitere Stigmata gekennzeichnet sein, wie etwa Nagelveränderungen (Tüpfelnägel, Ölflecknägel, Krümelnägel). Komplikationen können sich durch wiederkehrende Hautinfektionen ergeben, an denen im Vergleich zur AD jedoch deutlich weniger Patienten leiden (6,7% vs. ca. 30%) [222, 224].

Durch die autoimmune Genese muss auch die Psoriasis als systemische Erkrankung betrachtet werden, bei der nicht ausschließlich die Haut betroffen ist. Nicht selten sind die Gelenke mit einem charakteristischen Befallsmuster in das Erkrankungsbild involviert, die sogenannte Psoriasisarthritis [223].

1.5.2.4 Immunhistologie der Psoriasis

Histologisch sieht man bei der Psoriasis eine Hyperproliferation der epidermalen Keratinozyten. Die Keratinozyten zeigen eine Dysregulation im Differenzierungsprozess auf, sie erscheinen phänotypisch unreif. Im *Str. corneum* sind noch Zellkerne nachweisbar, die Korneozyten sind folglich nicht regelrecht differenziert. Zudem führt die gestörte Sekretion extrazellulärer Lipide zu einer beeinträchtigten *Desquamation* [225]. Es kommt zu einer Infiltration von Th1- und Th17-Zellen in die Epidermis. Nicht nur die Dominanz von Th1/Th17-Zellen, sondern auch ein Defekt der Th2-Zellen scheint für die Ätiologie der Psoriasis von Bedeutung zu sein [59, 226]. Assoziiert ist ein alterniertes Level von IL-4R [227]. Zudem migrieren verstärkt polymorphe Neutrophile in die Epidermis. In den betroffenen Hautarealen findet außerdem verstärkt Neoangiogenese statt [59].

In der Haut von Erkrankten lassen sich ubiquitär erhöhte Zahlen von DCs nachweisen. Diese sind durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen besonders während der Initiation von hoher Bedeutung [208].

Durch die Schlüsselrolle, die GATA-3 sowohl in der Th-Zell-Differenzierung als auch in der epidermalen Regeneration zukommt, erlangt der Transkriptionsfaktor in diesem Zusammenhang besonderes Interesse. In läsionaler Haut von Erkrankten zeigt sich in den Keratinozyten im Vergleich zu gesunder Haut eine reduzierte Expression von GATA-3 [59, 228–230]. Auch das FLG-Level zeigt sich, besonders in akuten Läsionen, reduziert [121]. Kompensatorisch können antimikrobielle Peptide wie S100A-Proteine und β -Defensine bei GATA-3-Defizienz eine Hochregulation erfahren [62, 63].

Kennzeichnend für das Zytokin-Milieu der Psoriasis ist die Überexpression von TNF α . Über einen c-Jun-N-terminale-Kinase-abhängigen Signalweg ist TNF α an der Regulation der Protein-Expression beteiligt [114]. In der Psoriasis sind frühe Differenzierungsmarker überexprimiert, während die Expression später Differenzierungsmarker (FLG, LOR) reduziert ist [59]. TNF α scheint die Expression der epidermalen Strukturproteine folglich nicht global, sondern individuell zu modulieren [114]. Hierfür spricht auch, dass im Vergleich zu nicht-beeinträchtigten Hautstellen von Patienten die Expression von FLG in Läsionen stärker reduziert ist. Ähnliche Beobachtungen ließen sich in Bezug auf LOR machen [114, 231].

1.5.2.5 Pathophysiologie der Psoriasis

Eine schematische Darstellung der Pathophysiologie ist in **Abbildung 9** zu finden.

Begünstigend sind die erhöhten Anzahlen von T-Zellen und DCs, die in der Epidermis resident sind. Durch verschiedene Triggerfaktoren wird die Sekretion der Th1/Th17-assoziierten Interleukine IL-23 und IL-12 verstärkt. Diese induzieren die Produktion weiterer Zytokine aus Th1/Th17-Zellen, wobei insbesondere IFN- γ und TNF hohe Bedeutung zukommt. Nachgeschaltet ist die Aktivierung zahlreicher Gene, die zu großen Anteilen über die Signalwege TNF/STAT1 sowie TNF/IL-1/NF- κ B erfolgt [232]. Die Hochregulation von über 1300 Genen in Psoriasis deutet jedoch auf weitere Mechanismen und Signalwege in der Pathophysiologie der Erkrankung hin [229]. An der Gen-Aktivierung scheinen insbesondere auch IL-20 und IL-22 beteiligt zu sein [233, 234].

Neben Th1-Zellen sind IL-17 produzierende T-Lymphozyten, sog. Th17-Zellen charakteristisch für die Zellinfiltration in der Haut. Th17-spezifisch ist IL-17. In frühen Entzündungsstadien treibt IL-17 die Inflammation voran, bleibt aber auch nach der akuten Situation dauerhaft nachweisbar [235–237]. Genaue Mechanismen der Wirkweise von IL-17 sind noch nicht ergründet. Es sind jedoch bereits zahlreiche Effekte der IL-17-Stimulation bekannt, zu denen neben der Regulation prozessierender Enzyme der FLG-Modifikation die Herunterregulation von Adhäsionsproteinen und die Induktion von *SPR proteins* zählen [121]. Die reduzierte FLG-Expression ist auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar, so dass neben der prozessierenden Ebene auch auf Ebene der Transkription durch Zytokine reguliert wird [121].

Insgesamt beeinflussen die Zytokine die Proliferation der Keratinozyten [208]. Die Herunterregulation von FLG kann ebenfalls über TNF α erfolgen [121]. Inhibiert wird ebenfalls die Expression von LOR und IVL, so dass die Regulation über einen anderen Signalweg als bei

IL-17 vermutet werden kann. Interessanterweise induziert $\text{TNF}\alpha$ ebenfalls das antimikrobielle humane β -Defensin-2 (hBD2) [121]. Dies könnte ein Hinweis auf die relativ betrachtet niedrigere Suszeptibilität von Psoriasis-Patienten im Vergleich zu an AD-Erkrankten sein, da die Expression von HBD-2 durch Th2-Zytokine nicht beeinflusst ist. Ein kompensatorischer Effekt könnte in Bezug auf Suszeptibilität gegenüber Infektionen angenommen werden [62, 121].

1.5.2.6 Die epidermale Barriere bei Erkrankung an Psoriasis

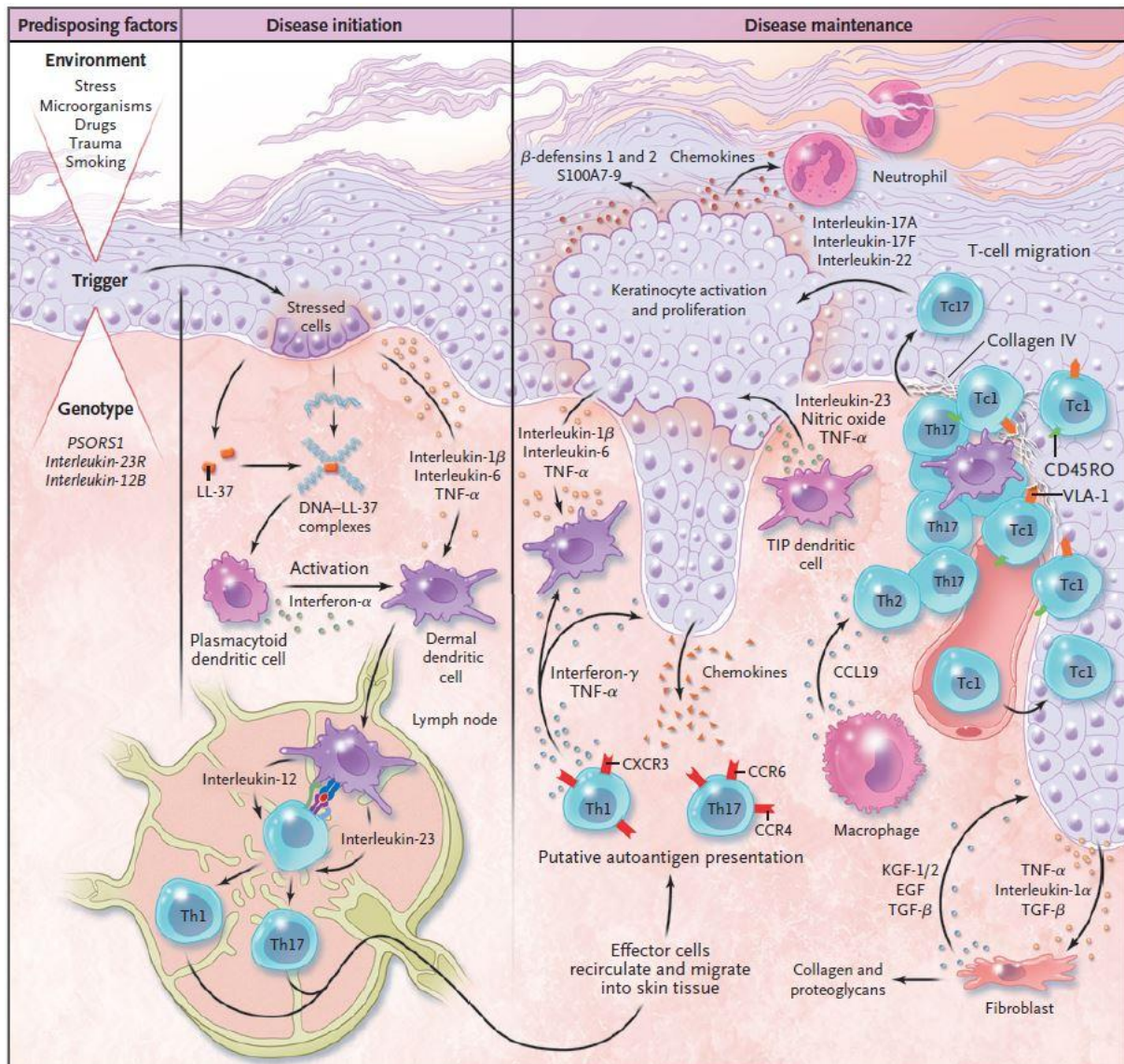


Abbildung 9. Pathophysiologie der Psoriasis. Initial führen Trigger aus Umwelt sowie die Genetik zur Prädisposition der Erkrankung. Von zentraler Bedeutung ist die resultierende Ausschüttung von IFN- α , gefolgt von der Aktivierung von Th1- und Th17-Zellen. Es kommt zur Dysregulation der Immunantwort. Entscheidend ist die Präsentation von Autoantigenen sowie die anhaltende Sekretion proinflammatorischer Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, IFN- γ , IL-17, IL-22). Die Stimulation mit den Zytokinen führt zur Hyperproliferation der Keratinozyten. Diese Abbildung ist die Figure 3 aus Nestle 2009, Referenz 239.

Die Störung der Barrierefunktion ergibt sich einerseits durch den Einfluss der Zytokine auf die Expression der Proteine des CE. Durch den beschriebenen Defekt in der FLG-Prozessierung ergibt sich ebenfalls ein Mangel an NMF, konsekutiv eine Störung der Hydratation der epidermalen Barriere mit erhöhter Suszeptibilität [120]. Andererseits stützt die Imbalance zwischen Differenzierung und Proliferation (mit Verschiebung in Richtung Hyperproliferation) den Defekt der Barrierefunktion [238, 239]. Genaue Mechanismen der Barriestörung sind noch nicht vollständig aufgedeckt [121], jedoch korreliert die Barriestörung mit der Schwere der Erkrankung [238].

1.6 Zielsetzung

Diese Arbeit untersucht die Rolle des Transkriptionsfaktors GATA-3 in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere. Während der Transkriptionsfaktor zunächst als zentral in der Differenzierung von Th0- zu Th2-Lymphozyten und der Induktion von Th2-assoziierten Zytokinen galt, wird zunehmend die Bedeutung diskutiert, die ihm in der Differenzierung von Keratinozyten zukommt.

Der besagte Differenzierungsprozess ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Epidermis als sich kontinuierlich selbsterneuerndes Organ sowie für ihre Funktion als epidermale Barriere. Der epidermalen Barriere kommt vor allem eine Schutzfunktion in der Abgrenzung des Organismus zur Außenwelt zu. Bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis und der Psoriasis ist der komplexe Algorithmus, der zur Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere führt, beeinträchtigt.

In diesem Kontext soll der Einfluss des Transkriptionsfaktors GATA-3 auf die Differenzierung der Keratinozyten anhand schichtspezifischer Strukturproteine wie Filaggrin, Loricrin und Involucrin untersucht werden.

Insbesondere soll die Bedeutung von GATA-3 in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere unter solchen Konditionen untersucht werden, die die Pathophysiologie chronisch entzündlicher Hauterkrankungen simulieren. Eine Dysregulation von GATA-3 erscheint ein zentraler Punkt in der Genese dieser Erkrankungen zu sein.

Ein besseres Verständnis der Rolle des Transkriptionsfaktors GATA-3 in Keratinozyten könnte perspektivisch weitere Ansatzpunkte in der Behandlung chronisch entzündlicher Hautkrankheiten aufzeigen. Da GATA-3 bereits als *target* in der Behandlung der atopischen Dermatitis im Kontext des Th2-Zellinfiltrates diskutiert wird, sollen die Ergebnisse dieser Arbeit auch eine Abschätzung der Auswirkung auf die epidermale Barriere erlauben. Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung von GATA-3 in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere unter physiologischen und pathophysiologischen Konditionen einzuordnen.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

Ein positives Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Hochschule Hannover lag zu Beginn dieser Arbeit vor.

Die primären humanen Keratinozyten, die für diese Arbeit in der Zellkultur Verwendung fanden, entstammen der Zellbank der Abteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH). Es handelt sich um Vorhaut-Keratinozyten von anonymen Spendern mit Zirkumzision der Kinderchirurgie, MHH. Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten der Zellkultur wurden unter den sterilen Bedingungen einer Reinraumwerkbank an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, werden Materialien mit Ethanol 70% gereinigt.

2.2 Auftauen von Keratinozyten

Zu Beginn des Auftauens wird eine Zellkulturflasche (75cm²) mit 20ml auf 37°C vorgewärmtes Medium befüllt.

Die Keratinozyten werden bei -196°C in Kryoröhrchen in einem Stickstofftank mit Stickstoff der gasförmigen Phase gelagert. Diesem werden sie für das Auftauen entnommen und sofort in das Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C überführt. Der Auftauprozess des Kryoröhrchens wird kontrolliert und das Röhrchen dem Wasserbad entnommen, sobald nur noch ein kleiner Teil der Probe gefroren ist.

Das Überführen in die Zellkulturflasche erfolgt unter der Sterilbank. Dort wird der Inhalt mit einer 5ml-Auslaufpipette aufgenommen und in das Medium der vorbereiteten Zellkulturflasche überführt. Anschließend wird die Zellkulturflasche im Brutschrank unter den Bedingungen von 5% CO₂ (Kohlenstoffdioxid), 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit gelagert.

Am folgenden Tag muss das Medium der Zellkultur gewechselt werden, um potentiell toxische Effekte des Kryomediums zu reduzieren.

2.3 Mediumwechsel der Keratinozyten in den Zellkulturflaschen

Vorbereitend wird eine entsprechende Menge des Zellkulturmediums steril in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Das Röhrchen wird nach etwa 15 min dem Wasserbad entnommen. Das weitere Procedere erfolgt unter der Sterilbank. Die Probe wird dem Brutschrank entnommen und unter die Sterilbank gestellt. Eine Glaskapillare wird an der Vakuumpumpe befestigt und der Inhalt der Zellkulturflasche so abgesaugt, dass die Glaskapillare keinen Kontakt zu der mit Keratinozyten bewachsenen Wand der Zellkulturflasche hat.

Mit einer 25ml Auslaufpipette werden 20ml des vorgewärmten Mediums aufgenommen und in die Zellkulturflasche überführt.

Der Wechsel des Mediums erfolgt alle zwei bis drei Tage, um eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährmedium sicherzustellen.

2.4 Passagieren der Keratinozyten

Die verwendeten Reagenzien sollten auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt sein. Ausgenommen ist das Trypsin/EDTA (TE), dessen enzymatische Aktivität dadurch reduziert würde.

Die Keratinozyten werden gesplittet, sobald eine Konfluenz von 80% erreicht ist. Dafür wird das in der Zellkulturflasche vorhandene Medium durch eine Glaskapillare abgesaugt. Die Zellen werden mit DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) gespült, indem einige ml DPBS in die Kulturflasche gefüllt werden und diese anschließend geschwenkt wird. Die Flüssigkeit wird dekantiert. In die 75cm² Zellkulturflasche werden 5ml EDTA 0,02% (Ethylendiamintetraessigsäure) mithilfe der Auslaufpipette gegeben. Die Zellkulturflasche inkubiert für 3-5 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Sobald das Lösen der Zell-Zell-Verbindungen im Lichtmikroskop zu erkennen ist, kann fortgefahren werden. Dafür wird EDTA 0,02% mit einer Glaskapillare abgesaugt und 5ml Trypsin/EDTA (beides bei Raumtemperatur) mit einer Auslaufpipette auf die Zellen gegeben. Die Zellkulturflasche wird für 3-5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Kontrolle unter dem Lichtmikroskop zeigt, dass sich die Keratinozyten von der Flaschenwand lösen. Zum Beenden der Ablösungs-Reaktion werden 5ml eines Trypsin-Inhibitors mit einer Auslaufpipette auf die Zellen gegeben. Nach mehrmaligem Spülen werden die Zellen in die Auslaufpipette aufgenommen und in ein zuvor beschriftetes Röhrchen mit Schraubverschluss überführt. Die Zellkulturflasche wird mit DPBS gespült und die Flüssigkeit anschließend aufgenommen, um in dasselbe Röhrchen überführt zu werden. Es folgt ein Waschgang (Zentrifugation bei 21°C, 200g, Rotor-Zahl 154, 5 Minuten). Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet in DPBS resuspendiert. Das Zentrifugieren wird bei identischen Einstellungen wiederholt, die Zellen somit in DPBS gewaschen. Der Überstand wird mit einer Glaskapillare abgesaugt. Das verbleibende Zellpellet wird in 1000µl PBS resuspendiert. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt. Hierfür werden 20µl der Suspension entnommen und in 180µl Türks Reagenz gegeben, so dass sich eine 1:10 Verdünnung ergibt. Nach dem Aufbereiten auf dem Vortexmischer werden 10µl der Suspension auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellen, die sich innerhalb der vier geschlossenen Felder der Neubauer-Zählkammer befinden, werden ausgezählt. Pro Probe wird dieser Vorgang zwei Mal ausgeführt und anhand des gebildeten Mittelwertes die Berechnung der Gesamtzellzahl wie folgt bestimmt, wobei der Kammerfaktor 10⁴ beträgt:

Zellzahl/ml = Mittelwert der ermittelten Zellzahl pro Großquadrat x Kammerfaktor x Verdünnung.

Mit den frisch passagierten Zellen kann unterschiedlich verfahren werden. Sie können wieder in Kulturflaschen oder auf Kulturplatten mit unterschiedlicher *well*-Größe gesetzt werden. Eine andere Möglichkeit besteht in der Lagerung durch Einfrieren.

Eingesetzte Zellzahlen für Zellkultur:

Zellkulturflasche 75cm ²	→	0,7 *10 ⁶ bis 1*10 ⁶
6well-Platte	→	2*10 ⁵
24well-Platte	→	4*10 ⁴
ChamberTek	→	5*10 ³

2.5 Einfrieren

Nach erneutem Zentrifugieren wird der Überstand vorsichtig abgesaugt, so dass das Zellpellet so trocken wie möglich ist. Mit einer Auslaufpipette wird es in 1,8ml Cryopan-Einfriermedium mit einer Temperatur von 4°C aufgenommen und in ein steriles Kryoröhrchen überführt. Zum schonenden Einfrieren wird das Kryoröhrchen in ein Kryo-Einfriergefäß (beispielsweise *Mr. Frosty*) gegeben und für 24h bei -80°C gelagert. Durch Verwendung eines solchen mit Isopropanol befüllten Einfriergefäßes wird eine Temperatursenkung von etwa 1°/min ermöglicht, so dass die Zellen schonend eingefroren werden. Anschließend werden die Röhrchen dem Einfriergefäß entnommen und in gasförmigem Stickstoff aufbewahrt.

2.6 Lentivirale Transduktion primärer humaner Keratinozyten

Zentral für diese Arbeit sind GATA-3 shRNA-gesilencte Keratinozyten, die für dieses Projekt im Vorfeld hergestellt wurden. Die lentiviralen Partikel wurden von der Firma *dharmacon* (Colorado, USA) bezogen.

Bei der lentiviralen Transduktion wird über einen Vektor die Expression einer shRNA induziert. Die RNA besitzt eine Haarnadelstruktur und ist in der Lage über den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) bestimmte Genabschnitte abzuschalten. Bei Bindung an komplementäre mRNA wird diese durch einen RNA-induzierten Silencing-Enzymkomplex degradiert, so dass es zur Reduktion der Genexpression kommt [240]. Lentivirale Partikel dienen hierbei als Vehikel für den Gentransfer. Polybrene werden dem Transduktionsmedium hinzugefügt, um die Permeabilität der Zellmembran zu erhöhen.

Für die lentivirale Transduktion werden Keratinozyten möglichst niedriger Passagen verwendet, die am Vortag mit einer Zellzahl von $8 \cdot 10^4$ auf einer 12 well Platte ausplattiert wurden. Pro well erfolgt nun die Zugabe von 500µl Transduktionsmedium, dem 3µg/ml Polybrene zugesetzt sind. Die lentiviralen Partikel werden auf Eis schonend aufgetaut. Die Menge der hinzuzufügenden lentiviralen Partikel (V) ergibt sich über folgende Formel:

$$V = \text{MOI} * \text{Zellzahl} / \text{VT}.$$

Die *multiplicity of infection* (MOI) gibt das Verhältnis der lentiviralen Partikel zu der vorhandenen Zellzahl an, es beträgt in diesem Projekt MOI = 16, wobei VT der Stock viraler Partikel ist. Da innerhalb von 24h erneut Zellteilungen stattgefunden haben, sollte die Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion eher mit $1 \cdot 10^5$ Zellen angenommen werden. Die Ansätze inkubieren 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird das Medium, das die lentiviralen Partikel enthält, durch 500µl Transduktionsmedium ersetzt. Die anschließende Inkubation

erfolgt über Nacht im Brutschrank. Am Folgetag erfolgt ein Mediumwechsel nach einmaligem Waschen in DPBS. Bis zur dritten Passage nach Transduktion erfüllen die Keratinozyten die Kriterien der Risikostufe S2, für die Zellkultur gelten die entsprechenden Bedingungen zur Sicherheit.

Für jeden Spender werden verschiedene Ansätze der lentiviralen Transduktion hergestellt. Zum einen werden Keratinozyten mit einem Vektor, der für eine GATA-3 shRNA (small hairpin RNA) kodiert, für GATA-3 gesilencet. Die gleiche Zellzahl des Spenders wird mit einem Vektor für eine nonsense shRNA behandelt, um Kontrollzellen zu generieren. Sie werden im Folgenden als control shRNA bezeichnet. Mithilfe dieser Zellen können Auswirkungen durch die lentivirale Transduktion jenseits des Silencing-Effekts beurteilt werden. Zudem wird eine entsprechende Zellzahl in Kultur gehalten, die gänzlich unbehandelt (im Folgenden auch als n.t. bezeichnet) bleibt. Zu Beginn der Arbeit standen drei verschiedene GATA-3 shRNA für die lentivirale Transduktion zur Verfügung, deren Effektivität im Verlauf evaluiert wurde, siehe **Kapitel 4.1**.

Zur Selektion erfolgreich transduzierter Keratinozyten wird dem Zellkulturmedium das Nucleosid-Antibiotikum Puromycin beigesetzt (1:10000, 5µl AB/ 50ml Medium).

2.7 Stimulationsschema der inflammatorischen Konditionen

Zentral ist die Fragestellung nach dem Einfluss des GATA-3 Silencing auf die Differenzierung, dem sich anhand der veränderten Expression der Differenzierungsmarker unter inflammatorischen Konditionen genähert werden soll. Optimiert wurden für die nachfolgenden Analysen die Zusammensetzung des Zytokinmilieus, die Stimulationsdauer sowie der Zeitpunkt des Stimulationsbeginns, siehe **Kapitel 4.3.2**.

Zusammenfassend lassen sich die Versuchsansätze für die Analysen des Transkriptionsfaktors GATA-3 sowie der ausgewählten Differenzierungsmarker in den folgenden Experimenten anhand des folgenden Stimulationsschemas (siehe **Abbildung 10**) vereinfacht darstellen. Zu beachten sind die oben erwähnten, zahlreichen Variablen, deren Einfluss auf die Expression der Proteine untersucht werden kann.

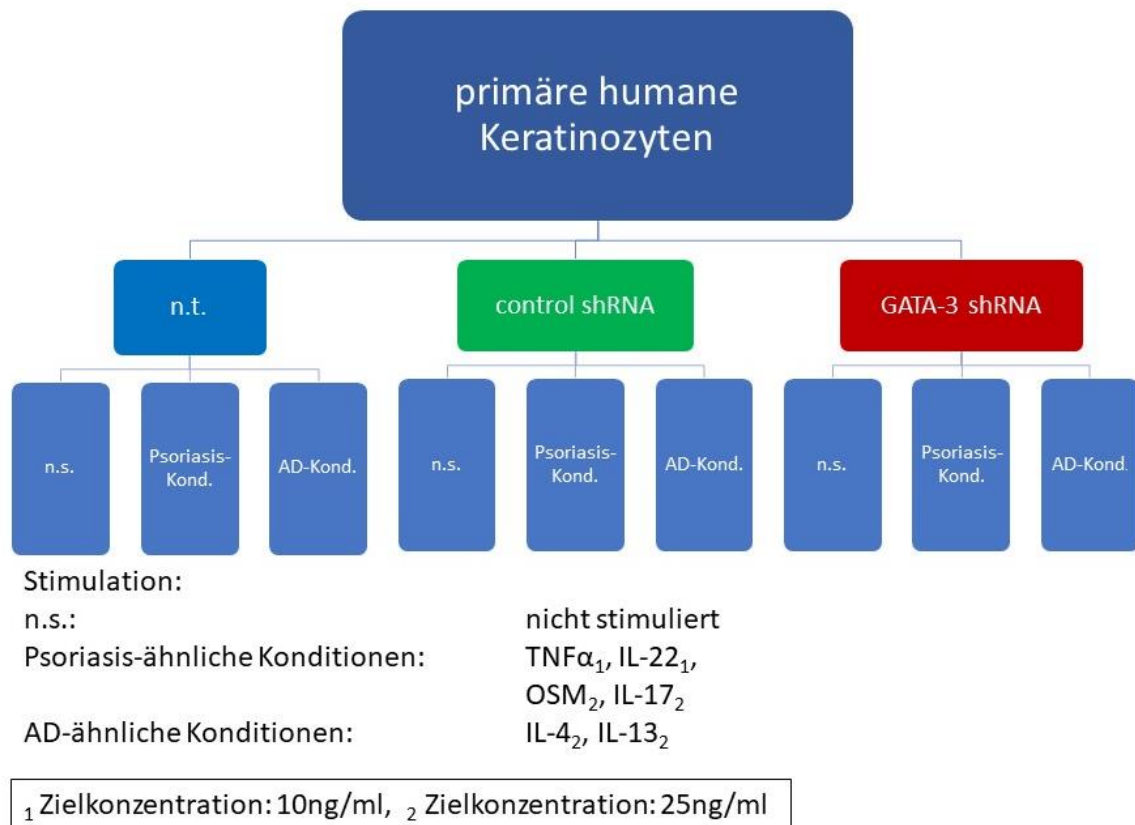


Abbildung 10. Vereinfachte Darstellung des Stimulationsschemas. Als Ausgangszellen wurden primäre humane Keratinozyten eingesetzt, die entweder unbehandelt (n.t., nicht-transduziert) blieben, mit einem Vektor einer nonsense shRNA (control) oder für eine GATA-3 shRNA transduziert wurden. Die Zellen wurden jeweils nicht weiter stimuliert oder unter Psoriasis- bzw. AD-ähnlichen Konditionen kultiviert. Zur Induktion der Differenzierung wurde jeweils Calcium verwendet, siehe **Kapitel 2.7.3.1**. Anschließend erfolgen Analysen von Transkriptionsfaktor GATA-3 sowie den ausgewählten Differenzierungsmarkern (primär FLG, LOR, IVL) auf mRNA- und Proteinebene.

2.7.1 Simulation von inflammatorischen Konditionen – Auswahl verschiedener Bedingungen

Um sich der Pathophysiologie von Psoriasis und atopischer Dermatitis annähern zu können, wurden anhand unterschiedlicher Zytokine entzündliche Bedingungen (den Hauterkrankungen ähnlich) simuliert. Verschiedene Konditionen wurden in Hinblick auf ihre Effekte an unbehandelten Keratinozyten getestet. Es sollten Konditionen ermittelt werden, die das inflammatorische Milieu bei Psoriasis bzw. bei AD simulieren, so dass die Expression von GATA-3 sowohl herunter- als auch heraufreguliert werden konnte. Neben den bereits beschriebenen Zytokinen findet in der Stimulation desweiteren Oncostatin M (OSM) Anwendung. OSM ist Mitglied der IL-6 Familie und wirkt synergistisch mit IL-17 [241].

Zunächst wurde ein Stimulationsschema entwickelt, um die unterschiedlichen entzündlichen Bedingungen zu simulieren. Anhand von beschriebenen Regulationsmechanismen für GATA-3 wurde die Behandlung der konfluenten Keratinozyten drei verschiedener Spender vor der Fragestellung, welche Faktoren die Expression von GATA-3 induzieren oder supprimieren, durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse in **Kapitel 4.3.2**. Stimuliert wurde wie folgt:

Tabelle 1. Initiales Stimulationsschema der Keratinozyten.

Stimulation	Zytokine				
<i>n.s.</i>	keine				
<i>Psoriasis- ähnliche Konditionen</i>	TNFα ₁	IL-22 ₁	IL-33 ₁		
	TNFα ₁	IFN-γ ₁			
	TNFα ₁	IL-22 ₁	OSM ₂	IL-1α ₂	IL-17 ₂
	TNFα ₁	IL-22 ₁	IL-17 ₂		
<i>AD-ähnliche Konditionen</i>	IL-4 ₂	IL-13 ₂			
	TNFα ₁	IL-22 ₁	IL-4 ₂	IL-13 ₂	
₁ Zielkonzentration: 10ng/ml, ₂ Zielkonzentration: 25ng/ml					

Das endgültige Stimulationsschema lautete wie folgt:

Tabelle 2. Finales Stimulationsschema der Keratinozyten.

Stimulation	Zytokine			
<i>n.s.</i>	keine			
<i>Psoriasis-ähnliche Konditionen</i>	TNFα ₁	IL-22 ₁	OSM ₂	IL-17 ₂
<i>AD-ähnliche Konditionen</i>	IL-4 ₂	IL-13 ₂		
1 Zielkonzentration: 10ng/ml, 2 Zielkonzentration: 25ng/ml				

Die Psoriasis-ähnlichen Konditionen werden im Folgenden z.T. als Th1/Th17-assoziierte Konditionen bezeichnet, die AD-ähnlichen Bedingungen auch als Th2-assoziiert.

2.7.2 Optimierung des Stimulationszeitraums

Im weiteren Verlauf wurde sich mit der Fragestellung beschäftigt, über welchen Zeitraum die Stimulation erfolgen sollte. Respektive wurden die Keratinozyten nach 24h, 3d sowie nach 5d lysiert. Die Ergebnisse sind graphisch in **Abbildung 21** dargestellt.

2.7.3 Optimierung des Stimulationszeitpunkts

Der Zeitpunkt der Stimulation variierte im Verlauf, um Versuchsergebnisse zu optimieren.

2.7.3.1 Optimierung des Stimulationszeitpunkts in der qRT-PCR

Um den idealen Zeitpunkt für den Stimulationsbeginn der Keratinozyten für die mRNA-Analyse zu ermitteln, wurden diese entweder zu dem Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung (ca. 75-100% Konfluenz) oder der Superkonfluenz (5 Tage nach Erreichen der Konfluenz) mit Calcium stimuliert. Dabei wurden zwei verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen für jeweils 3 Tage verwendet. Die Keratinozyten blieben einmal unbehandelt und wurden sonst mit je 1,3mM Ca^{2+} oder 2mM Ca^{2+} behandelt. Zeitgleich wurde die Stimulation mit den entsprechenden Zytokinen begonnen.

Calcium ist ein Faktor, der zur Differenzierung von Keratinozyten beiträgt. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gibt das Signal zur Differenzierung [13, 60]. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration bewirkt die Permeabilisierung der Zellmembran intrazellulärer Granula, die zur Aktivierung der Transglutaminasen führt. Im Vergleich zu basalen Keratinozyten erfahren in Keratinozyten des *Str. granulosum* Proteine, die an der Calcium-Homöostase beteiligt sind, eine Hochregulation [94, 139].

2.7.3.2 Optimierung des Stimulationszeitpunkts für Untersuchungen von Keratinozyten mittels Western Blot

Keratinozyten, deren Extrakte mittels Western Blot untersucht wurden, wurden erst nach 5-tägiger Konfluenz stimuliert. Diese Zellen werden im Folgenden auch als „superkonfluent“ bezeichnet. Der Zeitraum der Stimulation betrug wie üblich 3 Tage.

2.8 3D-Hautmodell

Das 3D-Hautmodell stellt eine Möglichkeit dar, Keratinozyten in ihrem Differenzierungs- und Proliferationsverhalten außerhalb der Zellkultur (Monolayer) *ex vivo* zu beurteilen. Prinzipiell besteht das Hautmodell aus einer unteren Kollagen-Matrix, die Fibroblasten enthält, sowie einer oberen Matrix, in die $4-8 \cdot 10^5$ Keratinozyten aufgenommen werden.

Die basale Matrix bildet ein Collagen-Gel, das in mehreren Schritten synthetisiert wird. Ein Teil 1M NaOH (Natriumhydroxid) und ein Teil 1M HEPES-Puffer ergeben eine erste Lösung. Von dieser wird wiederum ein Teil mit einem Teil 10xDMEM-Medium gemischt, so dass eine zweite Lösung entsteht. Hiervon werden zwei Teile mit acht Teilen Kollagen vermischt. Die visköse Lösung sollte in der Farbe homogen und luftblasenfrei sein. In das Gel werden direkt

1*10⁶ Zellen/ml Gel aufgenommen. Verwendet werden gepoolte primäre humane Fibroblasten. Je 1ml der Suspension aus Zellen und Kollagen-Gel wird in ein Insert auf einer 12 *well* Platte gegeben. Während einer 2-3ständigen Inkubation im Brutschrank polymerisiert das Gel. Für die benötigte Zellzahl Keratinozyten werden die Zellen nach dem erläuterten Protokoll aus den Zellkulturflaschen gelöst. Die entsprechende Anzahl Keratinozyten wird in etwa 400µl Zellkultur-Medium „KGM ALI (*Air-liquid interface*)“ aufgenommen und auf das nun feste Gel aufgetragen. Das *well* wird mit Medium aufgefüllt, ohne dass es in das Insert übertritt. Am folgenden Tag wird das Medium abgesaugt und das Insert in spezielle Platten mit tiefen *wells* überführt. In diese *wells* werden mit einer Auslaufpipette 4,5ml Medium „KGM ALI“ gegeben. Jeden zweiten Tag erfolgt der Mediumwechsel mit „KGM ALI“. In dieser Arbeit werden die Hautmodelle 15 Tage in der Zellkultur geführt, wobei an Tag 12 nach Synthese die Stimulation begonnen wird. An Tag 15 werden die Hautmodelle aus dem Insert in mit Formalin befüllte Döschen überführt. Am Folgetag erfolgt die Überführung in eine Einbettkassette, mitsamt derer sie weiterhin in Formalin fixiert werden. Nach maximal 24h findet der Wechsel in Isopropanol (70%) statt.

2.9 Immunhistochemische Färbungen

Im Folgenden wird das Procedere der immunchemischen Färbung für die Immunhistologie- sowie die Immunfluoreszenz-Färbung beschrieben.

2.9.1 Fixierung und Einbettung

Zur Entwässerung werden die Proben in einen Entwässerungsautomaten (Thermo Scientific, Shandon Citadel 1000) gegeben. Hier durchlaufen sie eine Alkoholreihe, wobei sie in jeder Chemikalie für unterschiedliche Zeit verweilen:

70% Alkohol	für 3 Stunden;
90% Alkohol (2x)	für je 2 Stunden;
100% Alkohol (2x)	für je 2 Stunden;
Methylbenzoat (2x)	für je 2 Stunden;
Rotisol	für 1 Stunde;
Paraplast (2x)	für 1 Stunde und abschließend für 5 Stunden.

Die Einbettung findet in einem Einbettautomaten (Thermo Scientific, Shandon Histocentre 2000) statt.

Zum Einbetten in Paraplast wird die Probe der Einbettkassette entnommen und mit Hilfe einer Pinzette auf dem Grund einer Gussform aus Metall gehalten. Die Probe wird mit auf 60°C erwärmtem Paraplast übergossen und anschließend durch eine Kälteplatte schnell heruntergekühlt, so dass der entstehende Block aushärtet.

2.9.2 Herstellung der Schnitte

Die Anfertigung der Schnitte aus den eingebetteten Proben erfolgt an einer Schneidemaschine (Microtom). Die Schnittdicke beträgt 5µm. Durch ein Bad im auf 36°C erwärmten Wasser glätten sich zum Teil vorhandene Fältchen der Schnitte. Aus dem Wasserbad werden die Schnitte mit einem Glasobjektträger aufgenommen. Es werden immer mindestens 2 Schnitte nebeneinander platziert.

Zum Trocknen werden die Objektträger in einen Objektträgerhalter gestellt und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank gelagert.

Anschließend können die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.9.3 Entparaffinierung und Rehydratisierung

Die Entparaffinierung erfolgt in einer absteigenden Alkoholreihe, gefolgt von PBS.

Xylol:	3 x 5 Minuten
Xylol/Ethanol (1:1):	1 x 5 Minuten
Ethanol 96%:	2 x 5 Minuten
Ethanol 70%:	1 x 5 Minuten
PBS:	1 x 5 Minuten

2.9.3.1 Demaskierung des Antigens

Um die Epitope des Schnitts freizulegen, wird die Demaskierungslösung entsprechend der Empfehlung des Herstellers bezüglich des pH-Wertes gewählt. Sie wird auf 98°C erhitzt und die Schnitte im Anschluss an die Befreiung von Paraffin direkt in die vorgewärmte Lösung gegeben, in der sie für 70 min bei 95°C inkubiert werden. Das Abkühlen erfolgt etwa 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Objektträger für 5 min in PBS gewaschen. Durch das Erhitzen werden endogene Enzyme zerstört, so dass unspezifische Enzym-Substrat-Bindungen reduziert werden.

2.9.3.2 Block

Endogene Peroxidase-Aktivität muss in einem separaten Schritt unterdrückt werden, da sie hitzestabil ist. Hierfür wird auf die Schnitte eine Lösung mit 0,03% H₂O₂ (Wasserstoffperoxid), die ebenfalls Natriumazide enthält, aufgetragen.

2.9.4 Indirekte Färbung

In dieser Arbeit kommt das indirekte Verfahren der Immunchemie zur Anwendung, bei dem die Färbung der Schnitte in zwei Schritten erfolgt.

Zuerst wird ein Primärantikörper aufgetragen, der an spezifische Epitope des Gewebes bindet. In einem zweiten Schritt erfolgt nach zwischenzeitlichem Waschen in PBS das Auftragen eines für die Spezies spezifischen Sekundärantikörpers, der mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-

markiertem Polymer markiert ist. Der sekundäre Antikörper bindet an den primären Antikörper. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym erzeugt im Folgenden ein detektierbares Signal, sobald ein Substrat aufgetragen wird. Das Substratchromogen enthält 3-Amino-9-ethylcarbazole. Es kommt dort zu einer spezifischen Reaktion zwischen Enzym und Substrat, wo sekundärer Antikörper den primären Antikörper bindet. Das Resultat dieser Reaktion ist eine bräunliche Färbung, die eine qualitative Auswertung unter dem Lichtmikroskop ermöglicht.

Zuvor wird der Objektträger mit Eindeckmedium benetzt und mit einem Deckglas versehen.

Die immunchemische Färbung wurde mit dem Kit *Dako EnVision + System-HRP (DAB) For Use With Rabbit Primary Antibodies beziehungsweise For Use With Mouse Primary Antibodies* (beide Dako, Hamburg, Germany) durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgt nach Protokoll des Herstellers.

2.9.5 Immunfluoreszenz-Färbung

Bei diesem Färbeverfahren ist der angewandte Antikörper zusätzlich mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, so dass bei Bindung an den Zweitantikörper ein Signal im Fluoreszenz-Mikroskop detektiert werden kann.

2.9.6 Verwendete Antikörper und Färbeverfahren

Die verwendeten Antikörper in tabellarischer Aufführung:

Tabelle 3. In der Immunhistologie verwendete Antikörper.

Erster Antikörper	Verfahren	Stock-Konz., Verdünnung des ersten Antikörpers	pH-Wert der Demaskierungs- lösung	Zweiter Antikörper	Stock-Konz., Verdünnung des zweiten Antikörpers
Anti-Filaggrin antibody [SPM181] ab17808	Immun- fluoreszenz	0,2mg/ml, 1:50	pH9	Alexa Fluor 546 anti- mouse	2mg/ml, 1:500
GATA-3 (D13C9) XP Rabbit mAb	Indirekte Immun- histologie	424µg/ml., 1:1600	pH9	Goat F(ab')2 Anti-Rabbit IgG (H+L) – FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)	1,5mg/ml, 1:100
Loricrin Polyclonal Antibody, Purified	Immun- fluoreszenz	1mg/ml, 1:500	pH6	Alexa Fluor 546 anti-rabbit	2mg/ml, 1:500

2.10 Gewinnung von Extrakten aus Keratinozyten

Aus den in dieser Arbeit verwendeten primären humanen Keratinozyten wurden Gesamtzell-, Zytoplasma- und Nuklearextrakte gewonnen. Die entsprechenden Verfahren werden im Folgenden beschrieben.

2.10.1 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Um Gesamtzellextrakte der Keratinozyten zu gewinnen, müssen die Zellen lysiert, die Zellmembran also aktiv aufgebrochen, werden. Nach dem Waschen in PBS werden die Zellen im *well* mit einem Reagenz zur Protein-Extraktion (M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) versetzt. Ergänzt wird dieses Reagenz durch Protease- und Phosphataseinhibitoren, die dem Abbau der Proteine durch endogene Proteasen und Phosphatasen während der Extraktion entgegenwirken.

2.10.2 Gewinnung von Nuklear- und Zytoplasmaextrakten

Zur Gewinnung von Nuklear- und Zytoplasmaextrakten wird das Kit *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf zwei Schritten. Zu Beginn wird die Zellmembran zerstört und zytoplasmatische Bestandteile auf diese Weise zugänglich gemacht. Durch Zentrifugieren werden intakte Zellkerne zurückgewonnen und anschließend durch Zugabe eines weiteren Reagenz lysiert. Die Extraktion der Nuklear- und Zytoplasmaextrakte erfolgt anhand des Herstellerprotokolls.

2.10.3 Gewinnung von RNA-Extrakten/ RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wird das *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche) verwendet.

Zu Beginn der Isolation werden die Zellen im *well* mit PBS gewaschen. Im Anschluss werden sie in *Lysis/-Binding Buffer* aufgenommen, durch den die Zellen lysiert und RNasen inaktiviert werden. Die Suspension wird in eine Kombination aus *High Filter Tube* und *Collection Tube* überführt. Dort binden Nukleinsäuren an die Glasfasern des *Filter Tube*. Der folgende Prozess besteht aus mehreren Schritten, während derer durch Zugabe eines DNA-verdauenden Enzyms und Zentrifugation mit diversen Waschpuffern die RNA gereinigt wird. In einem letzten Schritt wird die RNA im nukleasefreien, sterilen und bidestillierten Wasser eluiert.

Im Anschluss wird die RNA-Konzentration innerhalb einer Probe mittels *NanoDrop Spectrophotometer* (ThermoFisher) bestimmt. Es werden Doppelmessungen durchgeführt und zu weiteren Bestimmungen der berechnete Mittelwert eingesetzt.

RNA-Isolate werden bei -80°C gelagert.

2.11 cDNA-Synthese

cDNA bedeutet *complementary DNA* (dt.: komplementäre DNS). Als Vorlage für die cDNA-Synthese dient gereinigte RNA. Im Vergleich zur genomischen Doppelstrang-DNA liegt die cDNA als Einzelstrang vor und dient so als Matrize für die qRT-PCR. Um RNA-Konzentrationsunterschiede zwischen verschiedenen Proben eines Spenders möglichst gering zu halten, können diese mit RNase-freiem Wasser verdünnt werden. Die Berechnung der zu addierenden Menge Wasser orientiert sich an der Probe mit der geringsten RNA-Konzentration. Anzustreben sind gleiche Konzentrationen, da in folgenden Analysen wie der qRT-PCR, das Amplifikationssignal in Abhängigkeit zu der Ausgangskonzentration steht.

Angleichung der Konzentration:

$$\text{RNA-Menge} = (\text{Probe niedrigster Konzentration [ng/ml]} / \text{Konzentration Probe [ng/ml]}) \times 11\mu\text{l}.$$

Für die Synthese des cDNA-Stranges wird ein Mastermix angesetzt, der zu den Proben hinzugefügt wird. Die Bestandteile des Mastermixes sind im Folgenden gelistet:

- | | |
|--|---------------|
| • 5X Reaction Buffer | 4µl pro Probe |
| • RiboLock RNase Inhibitor | 1µl pro Probe |
| • 10mM dNTP Mix | 2µl pro Probe |
| • RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase | 1µl pro Probe |
| • Primer | 1µl pro Probe |

Das totale Volumen in den Röhrchen beträgt mit Mastermix und Probe 20µl, die sich aus 9µl Mastermix sowie 11µl RNA-Isolat zusammensetzen.

Zur Evaluation der RNA-Probe in Hinblick auf genomische DNA-Kontamination wird als Negativkontrolle ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase hergestellt (bezeichnet als „-RT“). Würde bei diesem Ansatz in der späten qRT-PCR die Detektion des *target* erfolgen, wäre auf eine Kontamination mit genomischer DNA rückzuschließen.

Die Reaktion erfolgt während der Temperaturerhöhung auf 42°C für 60 min. Durch eine weitere Temperatursteigerung auf 70°C erfolgt der Reaktionsstopp. Anschließend werden die Ansätze auf 4°C gekühlt und bei dieser Temperatur kurzfristig gelagert werden. Bei längerer Lagerzeit werden sie bei -20°C oder -80°C eingefroren.

2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen Amplifikation einer DNA-Sequenz. Das Prinzip der PCR beruht auf drei Schritten, die jeweils einen Zyklus bilden: Denaturierung, Annealing (Primerhybridisierung) und Elongation.

Für einen Versuchsansatz wird eine Ausgangs-cDNA (*template*) benötigt, ein Primer, von dem bekannt ist, dass er spezifisch an eine Sequenz aus dem Abschnitt der Ausgangs-DNA bindet sowie Oligonukleotide, die das Ausgangsmaterial zur Synthese neuer Stränge bilden, und ein Enzym, die Polymerase, das die Reaktion katalysiert.

2.12.1 Denaturierung

Durch Erhitzen der *template*-cDNA auf 94°C kommt es zur Auftrennung der als Doppelstrang vorliegenden DNA-Sequenz.

2.12.2 Primerhybridisierung/Annealing

Das Abkühlen des Ansatzes auf die Annealing-Temperatur führt zu einem Binden der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz. Die Primerhybridisierung wird auch als Annealing bezeichnet. Die Annealing-Temperatur richtet sich nach dem Primer und dessen Schmelztemperatur, für die Versuche dieser Arbeit beträgt sie 55°C.

2.12.3 Elongation

Der Elongationsschritt umfasst eine erneute Erhöhung der Temperatur auf 72°C, bei der das Arbeitsoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase liegt. Die Synthese des Zweitstranges folgt dem im Annealing-Schritt hybridisierten Primer.

2.12.4 Quantitative Real time-Polymerase-Kettenreaktion: Bestimmung der relativen Konzentration mittels $\Delta\Delta CT$ -Methode

Diese Arbeit macht sich eine spezifische Anwendung der PCR zunutze, die als quantitative Real Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) bezeichnet wird. Bei dieser Form des Verfahrens wird im Anschluss an die Elongation eines jeden Zyklus das Signal des Amplifikats quantifiziert. Dies geschieht durch den Farbstoff *SYBR GREEN* (Qiagen), der der PCR-Reaktion beigegeben ist. Er interkaliert mit der doppelsträngigen DNA und erzeugt so ein Fluoreszenzsignal, das von dem Gerät *LightCycler 2.0* (Roche), an dem die qRT-PCR durchgeführt wird, detektiert wird. Die Intensität des Signals, beziehungsweise der hierüber ermittelte CP-Wert, dient zur Berechnung der relativen Menge des *target* in der Ausgangsprobe. Die Quantifizierung erfolgt über die Software *RelQuant* (Roche), die die Konzentrationsmessungen der Zielstruktur (*target*) ins Verhältnis zu den Messungen eines Referenz-Genes (Haushaltsgen, *reference*) der gleichen Probe setzt. Dabei sollte das Haushaltsgen in diesem System nicht reguliert sein und konstant exprimiert werden. Zudem sollte das Expressionslevel nicht zu stark von dem des *target* abweichen. Es handelt sich folglich um eine endogene Kontrolle. Das Ergebnis wird als eine Ratio (*target/reference*) ausgegeben [242]. Normalisiert wird in dieser Arbeit auf die jeweils nicht-stimulierte Probe der unbehandelten Keratinozyten des jeweiligen Spenders, falls nicht anders beschrieben dient sie als Kalibrator.

Die Berechnung der relativen Menge des *target* basiert auf der Bestimmung des *Crossing Point* (CP) und der Effizienz der Amplifizierungsreaktion. Der CP-Wert gibt an, bei welcher Zyklusanzahl das Amplifikationssignal erstmalig signifikant das Hintergrundsignal übersteigt. Die Berechnung der relativen Konzentration erfolgt anhand der *Delta-Delta CT*-Methode [242, 243].

Als Ausgangswert dienen die CT-Werte von *target* und Haushaltsgen (engl.: *housekeeping genes*, HKG) der entsprechenden Probe und des Kalibrators:

- CT_{target} Probe
- CT_{HKG} Probe
- CT_{target} Kalibrator
- CT_{HKG} Kalibrator.

Zunächst wird die ΔCT für Probe und Kalibrator aus der Differenz der CT_{target} und CT_{HKG} berechnet:

- $\Delta CT \text{ Probe} = CT_{target} \text{ Probe} - CT_{HKG} \text{ Probe}$
- $\Delta CT \text{ Kalibrator} = CT_{target} \text{ Kalibrator} - CT_{HKG} \text{ Kalibrator}.$

Aus den ΔCT -Werten wird zur Berechnung des $\Delta\Delta CT$ -Wertes die Differenz gebildet. Bei der Ermittlung der $\Delta\Delta CT$ Kalibrator entspricht die ΔCT Probe der ΔCT Kalibrator:

- $\Delta\Delta CT \text{ Probe} = \Delta CT \text{ Probe} - \Delta CT \text{ Kalibrator}$
- $\Delta\Delta CT \text{ Kalibrator} = \Delta CT \text{ Probe} - \Delta CT \text{ Kalibrator}.$

Es folgt die Berechnung der relativen Konzentration der Probe zum Kalibrator mit $R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$:

- $R_{\text{Probe}} = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$
- $R_{\text{Kalibrator}} = 2^{-(\Delta\Delta CT)} = 2^{-0} = 1.$

Der Ansatz für die qRT-PCR pro Probe lautet wie folgt:

- 10µl *SYBR GREEN* Mastermix
- 7µl *RNase free water*
- 2µl Primer des entsprechenden *target*
- 1µl Probe cDNA

Neben den Proben wird für jedes *target* ein Ansatz mit der Probe aus der cDNA-Synthese ohne das Enzym Reverse Transkriptase (-RT) benötigt. Auf diese Weise wird für eine Kontamination mit genomischer DNA kontrolliert. Außerdem wird eine Wasserprobe pipettiert, die ausschließlich den Mastermix aus *SYBR GREEN*, *RNase free water* und Primer enthält. Kontaminationen der Proben oder Reagenzien können auf diese Weise enttarnt werden.

Die Ergebnisse des qRT-PCR werden in Form einer Schmelzkurve zur Überprüfung eines *target*-spezifischen Produkts ausgegeben.

Zu Beginn der Analysen der betreffenden *targets* wurde in dieser Arbeit eine qRT-PCR zu verschiedenen Verdünnungen der Proben durchgeführt, um die Effizienz der qRT-PCR zu optimieren. Dabei wurden die Proben pur, 1:10 und 1:100 verdünnt eingesetzt. Die Dilution wurde mit RNase-freiem Wasser durchgeführt.

Folgende *targets* werden bestimmt:

Target	(Abkürzung)	Primer
IL-4 Rezeptor	(IL4R1)	Hs_IL4R_1_SG QuantiTect Primer Assay
IL-4 Rezeptor	(IL4R2)	Hs_IL4R_vb.1_SG QuantiTect Primer Assay
Kallikrein-1	(KLK1)	Hs_KLK_1_SG QuantiTect Primer Assay
GATA-3	(GATA3)	Hs_GATA3_1_SG QuantiTect Primer Assay
FLG	(FLG)	Hs_FLG_1_SG QuantiTect Primer Assay
LOR	(LOR)	Hs_LOR_2_SG QuantiTect Primer Assay
IVL	(IVL)	Hs_IVL_1_SG QuantiTect Primer Assay
Ribosomal Protein S20	(RPS20)	Hs_RPS20_1_SG QuantiTect Primer Assay
Phosphoglyceratkinase -1	(PGK-1)	Hs_PGK1_1_SG QuantiTect Primer Assay

Tabelle 4. Targets der qRT-PCR.

2.13 mRNA Microarray (MA)

Die MA-basierte Transkriptomanalytik ist eine Technik, die Gene in Form von mRNA identifizieren kann und so eine Beurteilung der Genaktivität zulässt. Grundlage für den MA ist ein Chip, der als Träger für bestimmte Nukleinsäure-Fragmente dient. Die DNA-Fragmente des Chips liegen als Einzelstränge in einer fluoreszenzmarkierten Form vor. Die zu analysierende RNA-Probe wird vor dem Auftragen ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Binden komplementäre Sequenzen aneinander, ergibt sich eine Mischfarbe der Fluoreszenzfarbstoffe. Über die Detektion des Fluoreszenzsignals können Aussagen über die Intensität und Lokalisation getroffen werden [244].

Die MA-basierte Transkriptomanalytik wurde freundlicherweise von der Zentralen Forschungseinrichtung *Transcriptomics* der MHH unter Leitung von Dr. rer. nat. Oliver Dittrich-Breiholz durchgeführt.

Für diese Arbeit wurden Proben von jeweils zwei Spendern gepoolt, die zuvor die gleiche Behandlung erhielten. Dieser Ansatz ermöglicht den Vergleich der Genexpression zwischen GATA-3 shRNA transduzierten Zellen und Kontrollzellen sowie den Vergleich der Genexpression unter basalen und entzündlichen Konditionen. Von jeder Probe werden 10µl RNA-Lösung verwendet. Die RNA-Konzentration der gepoolten Probe von 20µl wird erneut bestimmt.

Es liegen Proben folgender Behandlung vor:

- *control shRNA*: Ca^{2+} (2mM für 5 Tage)
- *control shRNA*: Ca^{2+} (2mM für 5 Tage) + **IL-22** (10 ng/ml für 4h) + **TNF α** (10 ng/ml für 4h)
- *GATA-3 shRNA*: Ca^{2+} (2mM für 5 Tage)
- *GATA-3 shRNA*: Ca^{2+} (2mM für 5 Tage) + **IL-22** (10 ng/ml für 4h) + **TNF α** (10 ng/ml für 4h)

Die Auswertung der Datensätze erfolgt über eine Software, die Ergebnisse werden in *Microsoft Excel* (Microsoft Corporation) ausgegeben.

Die Ergebnisausgabe des Fluoreszenzsignals erfolgt als „processed signal“(PS). Dabei wird die Signalstärke des individuellen Arrays mit einem „scaling factor“ multipliziert, der sich wiederum aus dem Quotienten des "Referenz-75-Perzentil-Wertes" (der für die gesamte Serie auf 1500 gesetzt wurde) und der 75. Perzentile des individuellen Arrays (Array i) berechnet. Dementsprechend werden die normalisierten „processed signal“-Werte für alle Proben (Microarray-Datensätze) nach der folgenden Formel berechnet:

normalisiertes PSArray i = PSArray i x (1500 / 75. PerzentilArray i).

Eine untere Intensitätsschwelle wurde als 1 % des 75. Perzentil-Referenzwertes (= 15) definiert. Alle normalisierten PS-Werte, die unter diese Intensitätsgrenze fallen, werden durch den entsprechenden Ersatzwert von 15 ersetzt.

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte MA zeigt folglich Unterschiede in der Genexpression zwischen control shRNA und GATA-3 shRNA auf. Außerdem ermöglichen die Ergebnisse Aussagen über die Unterschiede zwischen unter basalen sowie entzündlichen Konditionen kultivierten Keratinozyten auf mRNA-Ebene zu treffen.

2.14 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, bei dem Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Trägermembran übertragen werden. Dem eigentlichen Blot, der Übertragung von Proteinen, geht zur Auftrennung des Proteingemisches eine Elektrophorese voraus. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern Proteine auf Grund ihrer Molekularmasse unterschiedliche Strecken in einem Gel. Durch folgende Versuche können die Proteine sichtbar gemacht werden, qualitative und quantitative Verfahren schließen sich an [245].

Eine Möglichkeit, die Proteine aufzutrennen, ist die sogenannte SDS-PAGE, die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.

2.14.1 Elektrophorese

Im ersten Schritt des Western Blots, der Elektrophorese, werden die Proben mit einem Auftragsbuffer (*Lane Marker Sample Buffers*) im Verhältnis 5:1 (4 Teile Protein-Probe + 1 Teil *Sample Buffer*) gemischt, bevor sie in einem Thermocycler auf 95°C erhitzt werden, um Proteine zu denaturieren. Es findet eine sogenannte Linearisierung der Proteine statt, die – Tertiär- und Sekundärstruktur gehen reversibel verloren. Vorsichtig wird die Suspension aus Auftragsbuffer und Proteinprobe in ein *well* der Gelkassette pipettiert. Durch anschließendes Abkühlen auf Eis und Zentrifugieren, setzen sich unlösliche Bestandteile des Proteingemisches am Boden des Röhrchens ab.

Außer den Proben werden zwei Leitern aufgetragen: *Prestained Protein Ladder* und *Unstained Protein Ladder*. Die Leitern bestehen aus Proteinen verschiedener Größe (und im Fall der *Prestained Protein Ladder* einer farblichen Markierung). Die *Prestained Protein Ladder* dient der Kontrolle, der Proteinübertragung auf die Membran während der Elektrophorese. Die *Unstained Protein Ladder* wird als Referenz für die Ermittlung der Proteinbanden benötigt. Zudem kann bei anschließender Membranfärbung die Größe der Proteine über den Bandenvergleich mit der Leiter ermittelt werden. Die *molecular weight protein ladder* besteht aus mehreren Proteinen verschiedener Größe. Jedes dieser Proteine enthält ein Bindungsstück für IgG-Antikörper, über deren Bindung im weiteren Verlauf ein Signal auf entsprechender Höhe detektiert werden kann.

Bei dem Gel handelt es sich um ein Polyacrylamid, dem Natriumdodecylsulfat (SDS) beigesetzt ist.

Polyacrylamid ist ein Polymer, bei dem Acrylamidmonomere durch N,N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt werden und so eine Art „dreidimensionales Netz“ ausbilden, dessen „Maschen“ je nach Konzentration des Acrylamids enger oder weiter sind. Proteine durchwandern dieses Netz bei Anlegen einer Spannung. Die Laufstrecke steht in Abhängigkeit zur Molekülgröße. Je geringer die Molekularmasse der Proteine ist, desto größer ist ihre elektrophoretische Mobilität. Das in dieser Arbeit verwendete Gel besitzt einen Acrylamidanteil mit einem Konzentrationsgradienten von 4% bis 20%, da es für die Größe der

betrachteten Proteine die optimale Auftrennung ermöglicht. Die Zugabe von SDS in das Gel führt zu mehreren Effekten. SDS-Moleküle sind amphipatisch, das bedeutet, dass sie in einen hydrophoben und einen hydrophilen Bereich unterteilt werden können. Lagern sich SDS-Moleküle an Proteine an, bewirken sie die Aufhebung hydrophober Bindungen, die innerhalb des Proteins höhere Strukturbildungen verursachen. Der hydrophile/polare Bereich des SDS ist stark negativ geladen, so dass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Es besteht ein konstantes Ladung-/Masse-Verhältnis (1,4g SDS/1g Protein). Man spricht von denaturierender Elektrophorese. Das Wandern der negativ geladenen, linearisierten Proteine im elektrischen Feld zur Anode ist folglich nicht länger von ihrer ehemaligen Ladung abhängig, sondern von ihrer Molekularmasse.

Eine spezielle Variante der SDS-Gelelektrophorese ist die diskontinuierliche Methode nach LÄMMLI. Hierbei geht dem Trenngel ein sogenanntes Sammelgel voraus, das dazu dient die Proteine in einer Bande zu fokussieren.

Die Gelkassette wird in die Blot-Kammer eingespannt. Zunächst wird der Innenraum zwischen einer Gelkassette und einer weiteren Gelkassette, alternativ eines Dummies, mit dem *Running Buffer* (Tris-HEPES-SDS) befüllt. Des Weiteren wird auch die äußere Blot-Kammer befüllt, um die Kassetten zu kühlen. Der Auftragspuffer, mit dem die Proben vorbereitet werden, enthält einen Farbstoff, der das Gel schneller durchwandert als die Proteine. Sobald dessen Laufront sich dem unteren Ende des Gels nähert, wird die Spannung nicht länger aufrechterhalten und die Elektrophorese somit beendet.

2.14.2 Blot/Transfer

Der Blot-Vorgang wird nach dem sogenannten Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Das Gel wird aus der Kassette gelöst und in dem Kathodenpuffer gewaschen. Parallel wird die Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) in dem Anodenpuffer äquilibriert. Kathoden- und Anodenpuffer sind Transferpuffer. Den Transferpuffern ist Methanol beigesetzt, der die Bindungen des SDS-Protein-Komplexes lockert, um die Bindungseffektivität zwischen Protein und NC-Membran zu erhöhen.

Für den Blot-Vorgang ist die Verwendung von sogenanntem *Blotting Paper* erforderlich. Dieses wird ebenfalls in dem entsprechenden Transferpuffer äquilibriert. Für das Blotten ist die Reihenfolge, in der die Bestandteile auf die Plattenelektrode (Anode) sortiert werden, essentiell. Von unten nach oben lautet die Abfolge wie folgt:

- Blotting Paper, in Anodenpuffer äquilibriert
- NC-Membran
- Gel
- Blotting Paper, in Kathodenpuffer äquilibriert

Durch Verschluss der Apparatur wird die Kathode auf dieser Abfolge installiert. Das Anlegen einer Spannung erzeugt ein senkrecht zu Gel und NC-Membran stehendes elektrisches Feld. Die Proteine werden aus dem Gel auf die NC-Membran transferiert.

2.14.3 Block

Auf den eigentlichen Blot-Vorgang folgt der Block unspezifischer Epitope auf der NC-Membran, so dass Nachweisantikörper im Folgenden dort nicht mehr binden können. Eine Möglichkeit des Blockens besteht durch die Inkubation der NC-Membran in einer Suspension mit einem für den Versuch irrelevanten Protein. Dieses Protein lagert sich an unspezifische Proteinbindungsstellen an und macht sie für Antikörper unzugänglich. Hierfür wird Milchpulver in TBST verdünnt, so dass eine 5%-Lösung entsteht.

Waschvorgänge zwischen den einzelnen Schritten erfolgen in TBS mit 0,05% Tween 20.

2.14.4 Indirekte Antikörpermarkierung/Staining

Die Trägermembran wird mit dem verdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4°C zur Inkubation auf einem Plattformshaker platziert. Die entsprechende Konzentration wurde titriert und ist im Labor etabliert. Der primäre Antikörper bindet antigenspezifisch an das Protein. Detektiert wird diese Bindung über einen Sekundärantikörper, der an den konstanten Teil des Primärantikörpers bindet. Der sekundäre Antikörper wird speziesspezifisch nach dem Primärantikörper gewählt. Der Sekundärantikörper ist wiederum an ein Enzym (Meerrettichperoxidase) gekoppelt, das nach Zugabe der Substratlösung ein potentiell detektierbares Signal erzeugt. Der Sekundärantikörper wird konstant 1:2000 verdünnt eingesetzt, wobei er in Milchpuffer 5% gelöst wird.

Die eingesetzten Verdünnungen der Antikörper entsprechen weitestgehend den Empfehlungen der Hersteller. Eine Ausnahme ist der Einsatz des FLG-Antikörpers, der vom Hersteller nicht für die Verwendung im Western Blot ausgezeichnet ist. In einer Verdünnungsreihe konnte jedoch eine geeignete Verdünnung des FLG-Antikörpers im Western Blot ermittelt werden, siehe **Kapitel 4.6.1**. Verwendet wurde eine Probe zytoplasmatischer Extrakte von nicht-stimulierten Keratinozyten, die mit control shRNA behandelt wurden.

Für weitere Analysen der Differenzierungsmarker wurden in dieser Arbeit zytoplasmatische Extrakte (für die *targets* FLG, IVL, LOR) und Nuklearextrakte (für das *target* GATA-3) verwendet. Die aufgetragenen Proben werden in den Eigenschaften Spender, shRNA-Behandlung und Stimulation unterschieden.

In dieser Arbeit wird der Western Blot für die folgenden Primärantikörper mit der in der Tabelle angegebenen Verdünnung mit spezifischem Sekundärantikörper durchgeführt:

target, Catalog #; Lot-No.	Stock-Konz., Spezies, Verdünnung	Sekundär- antikörper	HKG, Catalog #; Lot #	Stock-Konz., Spezies, Verdünnung	Sekundär- antikörper
Anti-Filaggrin, ab17808; k.A.	0,2 mg/ml, Mouse, 1:250	Anti-mouse IgG, HRP- linked Antibody	GAPDH, 14C10; 10	k.A., Rabbit, 1:1000	Anti-rabbit IgG, HRP-linked
GATA-3 XP Rabbit mAb, D13C9; 3	424µg/ml, Rabbit, 1:1000	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Histone H3, 96C10; k.A.	k.A., Mouse, 1:1000	Anti-mouse IgG, HRP- linked Antibody
Loricrin Polyclonal Antibody, PRB- 145PM k.A.	1mg/ml, Rabbit, 1:1000	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	β-Actin Mouse mAb, 8H10D10; 1	k.A., Mouse, 1:1000	Anti-mouse IgG, HRP- linked Antibody
Monoclonal Anti-Involucrin antibody 19018; k.A.	2mg/ml, Mouse, 1:1000	Anti-mouse IgG, HRP- linked Antibody	GAPDH, 14C10; 10	k.A., Rabbit, 1:1000	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody

Tabelle 5. Targets des Western Blot.

2.14.5 Visualisierung/Detektion

Die Visualisierung durch Enzymmarkierung (wie Meerrettichperoxidase) erfolgt indirekt. Die Zugabe eines Substrates hat eine Enzymreaktion zur Folge. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym katalysiert eine Reaktion, deren Resultat ein lumineszierendes Produkt ist. Die Detektion erfolgt im *luminescence reader* (Hamamatsu).

2.14.6 Membranfärbung

Die Membranfärbung wird durchgeführt um den Erfolg der Proteinübertragung während des Blotting-Vorganges zu evaluieren. Für die Färbung wird die NC-Membran zunächst in VE-H₂O gewaschen. Anschließend wird sie für 30 sec auf dem Plattform-Shaker in *MemCode Reversible Protein Stain* inkubiert. Um die Hintergrund-Färbung zu reduzieren, wird die NC-Membran dreimal in *MemCode Destain Solution* gewaschen, wobei der letzte Waschvorgang 5 min dauert. Es folgen 4 weitere Waschgänge in VE-H₂O, wiederum erfolgt der letzte Waschschrift über einen Zeitraum von 5 min. Der Waschprozess wird auf dem Plattform-Shaker durchgeführt. Die gefärbte Membran kann nun in Folie eingescannt oder kopiert werden. Die Membranfärbung dient als Grundlage für die Auswertung des Western Blots. Sie erlaubt nicht nur eine qualitative Beurteilung des Proteingehalts der Proben und damit eine Evaluation des Blotting-Vorganges, sondern kann ebenfalls als Grundlage für die Quantifizierung verwendet werden. Abweichungen in der Expression von Referenzgenen haben so keinen direkten Einfluss auf die semiquantitative Analyse [246].

2.14.7 Auswertung

Die quantitative Auswertung des Western Blots erfolgte mithilfe der Software *ImageJ* (National Institute of Health, *open source*). Das Programm ermöglicht die Quantifizierung visueller Signale. Beim Western Blot können die Banden der verschiedenen *lanes* so verglichen werden. Die Intensität des Lichtsignals wird in Form eines Histogramms dargestellt. Für die Quantifizierung wird die Fläche unter der Kurve des Histogramms gemessen. Die ermittelte Zahl beschreibt somit die Intensität der Lichtbande.

Um die Expression des *target*-Proteins beschreiben zu können, wird das quantifizierte Ergebnis für das *target* ins Verhältnis zu der Expression des Haushaltsgenes gesetzt. Normalisiert auf das Haushaltsgen sind Aussagen über eine verstärkte respektive verminderte Expression zu tätigen.

2.15 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Software *GraphPad Prism*, Version 5, Version 7, Version 8 und Version 9 (San Diego, California), durchgeführt. Zudem wurde Microsoft® Excel® 2019 MSO zur statistischen Auswertung verwendet.

Die Auswertungen von Western Blot und qRT-PCR beziehen sich auf unabhängig voneinander ausgeführte Experimente. Die Messungen innerhalb der Stichproben sind unabhängig. Als Referenzwert gilt, falls nicht anders beschrieben, die Messung für die nicht stimulierten, nicht behandelten Keratinozyten oder die nicht stimulierten Kontrollzellen (*control shRNA*). Entsprechend der experimentellen Fragestellung werden die vorliegenden Daten als verbundene Stichproben betrachtet, da an den gleichen Fällen eine Kontrollprobe mit einer behandelten Probe verglichen wird.

Zunächst wurden für die Datensätze nichtparametrische Tests auf Normalverteilung durchgeführt. Entsprechend der Fallzahl wurden verschiedene Testverfahren angewendet. Bevorzugt wird entsprechend der Literatur der Test auf Normalverteilung nach D'Agostino-Pearson angewendet, dem die höhere Power zugesprochen wird [247, 248]. Limitiert wird der D'Agostino-Pearson-Test durch eine Fallzahl von $n \geq 8$. Bei kleinerer Fallzahl bieten sich andere nichtparametrische Tests auf Normalverteilung an, wie der Test nach Kolmogorov-Smirnov oder Shapiro-Wilk. Der Kolmogorov-Smirnov-Test untersucht ebenfalls, ob die untersuchten Variablen einer Grundgesamtheit normalverteilt sind. Er ist ab einer Fallzahl von $n \geq 5$ durchführbar. Der Shapiro-Wilk-Test wird mit der Methode nach Royston durchgeführt und ist bereits ab einer Fallzahl von $n \geq 3$ anwendbar. Der Test nach Kolmogorov-Smirnov wird generell weniger empfohlen, speziell bei kleinen Fallzahlen wird ihm jedoch eine größere Power zugesprochen, so dass er in dieser Arbeit vielfach Verwendung findet [247].

Entsprechend des Ergebnisses des Tests auf Normalverteilung wird das Testverfahren ausgewählt. Bei Normalverteilung der Abweichungen wird der Test auf Signifikanz mit dem t-Test für gepaarte Proben durchgeführt. Über den p-Wert wird hier die Wahrscheinlichkeit

ermittelt, dass ein mindestens so großer Unterschied wie ermittelt nur zufällig zustande kommt. Ein kleiner p-Wert spricht folglich für die Bestätigung der Alternativhypothese.

Für nicht normalverteilte Datensätze wird der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt. Auch hier lässt ein kleiner p-Wert die Annahme zu, dass beobachtete Unterschiede nicht zufällig sind, sondern auf wirklich unterschiedliche Mediane der Gruppen zurückzuführen sind.

Sowohl für den t-Test für verbundene Stichproben als auch für den Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben wurde die Signifikanz wie folgt definiert:

Als signifikant gilt ein Ergebnis, wenn $p < 0,05$.

3 Material

3.1 Zellkulturmedium

Tabelle 6. Zellkulturmedien.

Zellkulturmedium	Zusammensetzung; Hersteller, Catalog #
Keratinocyte Growth Medium 2	Basal Growth Medium; Promocell, #C-20211 SupplementPack; PromoCell, Heidelberg, Germany, #C-39011 BPE-15 hEGF-0,0625 HC-165 Insulin-2,5 Epinephrine-195 Transferrin-5 CaCl ₂ -0,5/0,06
„KGM ALI“	500 ml KBM; LONZA, Basel, Swiss, #CC-4131 1,3 ml CaC l ₂ 0,5M; Fa. PromoCell, Heidelberg, Germany, #C-34006 500µl Transferrin; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA, #T3309 (10µg/ml) 200µl Ascorbinsäure; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA, #A4544, (50µg/ml) 1,43 ml BSA in PBS 35%; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA, #A7979 (0,1%)
“KGM 3D”	500 ml KBM, LONZA, Basel, Swiss, #CC-3131 Supplements KGM, LONZA, Basel, Swiss, #CC-4131
Puromycin (10mg/ml)	Life Technologies, Carlsbad, California, USA, A11138-03

3.2 Zellkultur

Tabelle 7. Materialien der Zellkultur.

Reagenz	Hersteller, Catalog #
Collagen G	Biochrom, Berlin, Germany, L 7213
Cryopan, Serumfreies Einfriermedium	PAN, Aidenbach, Germany, P07-92050
DPBS	PAN, Aidenbach, Germany, P04-36500
EDTA	PAN, Aidenbach, Germany, P10-026100
Mr. Frosty Einfriergerät	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 51000001
Multiwellplatte, 6well	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany, 657160
Multiwellplatte, 24well	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany, 662160
Trypsin-EDTA Solution 1x (TE)	PAN, Aidenbach, Germany, P10-023100
Trypsin-Inhibitor 10mg/ml	PAN, Aidenbach, Germany, P10-033100
Türks Reagenz	Zentralapotheke MHH
Zellkulturflaschen 75cm ² (Nunc™)	Thermo Scientific, 10364131

3.3 Zellstimulation

Tabelle 8. Materialien der Zellstimulation.

Stimulanz/Zytokin	Hersteller, Catalog #
IL-13, human	PromoKine, Heidelberg, Germany, #C-62312
IL-17	R&D, Abingdon, United Kingdom, #11346174
Recombinant Human IL-22	PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA, #200-22
Recombinant Human IL-4	R&D Systems, Abingdon, United Kingdom, #204-IL
Recombinant Human Oncostatin M	PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA, #300-10
Recombinant Human TNF- α (carrier free)	BioLegend, San Diego, California, USA. #570104

3.4 3D-Hautmodell

Tabelle 9. Materialien des 3D-Hautmodells.

Reagenz	Hersteller, Catalog #
10x Dulbecco's Mem (DMEM)	Biochrom, Berlin, Germany, #F0455
12er Insert, pore size 3 μ m	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany, 665630
Collagen G	Biochrom, Berlin, Germany, #L7213
Deep well thinCert Plate	Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany, 665110
HEPES-Puffer 1M	Biochrom, Berlin, Germany, #L1613
Roti®-Histofix 4% in Probegeräß	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany, #3105.1

3.5 Immunhistologie

Tabelle 10. Materialien der Immunhistologie.

Reagenzien	Hersteller, Catalog #
Aceton	Roth, Karlsruhe, Germany, 3051.3
Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako, Hamburg, Germany, S3022
Dako EnVision + System-HRP (DAB) For Use With Mouse Primary Antibodies	Dako, Hamburg, Germany, K4005
Dako EnVision + System-HRP (DAB) For Use With Rabbit Primary Antibodies	Dako, Hamburg, Germany, K4011
Dako Target Retrieval, Citrate pH6	Dako, Hamburg, Germany, S2369
Dako Target Retrieval Solution, pH9 (10x)	Dako, Hamburg, Germany, S2367
Ethanol 96%, vergällt	Roth, Karlsruhe, Germany, T171.5
Ethanol 70%, vergällt	Roth, Karlsruhe, Germany, T913.3
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Germany, 3051.3
Goat serum	Dako, Hamburg, Germany, X0907
Hematoxylin Solution	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA, GHS332-1L
Menzel Gläser, 24*50mm	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, BB025050A1
Mounting Medium	Dako, Hamburg, Germany, S1964

Triton™ X-100	Roth, Karlsruhe, Germany, 3051.3
Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector, Burlingame, California, USA, H-1200
Xylol (Isomere) >98%, rein	Roth, Karlsruhe, Germany, 9713.3

3.6 Antikörper

Tabelle 11. Verwendete Antikörper.

Antikörper, Stock-Konzentration	Hersteller, Catalog #
Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), highly cross-adsorbed	Life technologies, Carlsbad, California, USA, A-11010
Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed	Life technologies, Carlsbad, California, USA, A-11003
Anti-Filaggrin antibody [SPM181] ab17808, 0,2mg/ml	Abcam, Cambridge, United Kingdom, ab17808
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, United States of America, #7076
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, United States of America, #7074
β-Actin (8H10D10) Mouse mAb (HRP Conjugate)	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, United States of America, #12262
GAPDH antibody, 0,69mg/ml	GeneTex, Irvine, California, USA, #GTX1001118
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, United States of America, #2118
GATA-3 (D13C9) XP Rabbit mAb	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA, #5852
GATA3(L50-823)	dianova, Hamburg, Germany, PHA-76951
Goat F(ab') ₂ Anti-Rabbit IgG (H+L) - FITC	Beckman Coulter, Danvers, Massachusetts, United States, #IM0833
Histone H3 (96C10) Mouse mAb	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, United States of America, #3638
Loricrin Polyclonal Antibody, Purified, 1mg/ml	Covance, Hitchin Hertfordshire, United Kingdom, PRB-145P
Monoclonal anti-involucrin	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA, I 9018
Mouse anti Strep-Tag Classic, 1,0mg/ml	AbD Serotec, Puchheim, Germany, MCA2489
Mouse IgG ₁ Isotype Control	R&D Systems, Abingdon, United Kingdom, MAB 002
Rabbit (DA1E) mAb IgG XP Isotype Control, 2,5mg/ml	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, United States of America, #3900
Rabbit IgG Isotype Control	R&D Systems, Abingdon, United Kingdom, AB-105-C

3.7 Gewinnung von Extrakten

Tabelle 12. Materialien zur Gewinnung von Extrakten.

Reagenzien	Hersteller, Catalog #
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 78440
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany, # 11828665001
M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, Illinois, USA, 78503
NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 78833
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, K1621
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Germany, 205311

3.8 qRT-PCR

Tabelle 13. Verwendete Primer.

Primer	Hersteller, Catalog #
Hs_FLG_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Germany, #QT00092218
Hs_GATA3_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Germany, #QT00095501
Hs_IL4R_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Germany, #QT00090013
Hs_IL4R_vb.1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Germany, #QT01002932
Hs_IVL_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Germany, #QT00082586
Hs_KLK_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Germany, #QT00020664
Hs_LOR_2_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Germany, #QT01663249
Hs_PGK1_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Germany, #QT00013776
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Germany, #204145
Hs_RPS20_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Germany, #QT00003290

3.9 Western Blot

Tabelle 14. Materialien des Western Blot.

Reagenzien	Hersteller, Catalog #
Bovine Serum Albumin solution	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA, A7284-50ML
BupH™ Tris-HEPES-SDS Running Buffer	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 10548723
Entwicklerlösung Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 34077
Lane Marker Sample Buffers	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 39000
MemCode™ Reversible Protein Stain Kit – For Nitrocellulose Membrane	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 24580
Milchpulver	Roth, Grenzach-Wyhlen, Germany, T145.2

PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 26616
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 26614
Precise™ Protein Gels, Tris-HEPES-SDS Precast Polyacrylamide Mini Gels, 10 well	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 25204
Precise™ Protein Gels Tris-HEPES-SDS Precast Polyacrylamide Mini Gels, 12 well	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 25224
Roti®-Blot A, Anodenpuffer zu Roti®-Blot 1, 10x Konz.	Roth, Grenzach-Wyhlen, Germany, L510.1
Roti®-Blot K, Kathodenpuffer zu Roti®-Blot 1, 10x Konz.	Roth, Grenzach-Wyhlen, Germany, L511.1
SuperSignal® Molecular Weight Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 84785
Tween® 20	Roth, Grenzach-Wyhlen, Germany, 9127.1
10x TBS, Tris buffered saline	Bio-Rad, München, Germany, #170-6435

3.10 Verbrauchsmaterial

Tabelle 15. Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller, Catalog #
Pasteurpipetten aus Glas 150 mm	Brand, Wertheim, Germany, #747715
Pasteurpipetten aus Glas 230 mm	Brand, Wertheim, Germany, #747720
PBS Dulbecco	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany, 0030 121.023
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany, 0030 120.086
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany, 0030 120.094
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany, 86.1253.001
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany, 86.1254.001
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany, 86.1685.001
Sterling Nitrile Powder-Free Exam Gloves, Größe 7,5	Kimberly-Clark, Irving, Texas, USA, KIM50707
Surgipath® Paraplast Plus®	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany, #X881.1
Zentrifugenröhrchen 15ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany, 188 261
Zentrifugenröhrchen 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany, 227 261
1,5ml Mikroröhre PCR-PT	Sarstedt, Nümbrecht, Germany, #72.692

3.11 Geräte- und Software-Verzeichnis

Tabelle 16. Geräte- und Software-Verzeichnis.

Gerät/Software	Hersteller
Adobe Illustrator 5.1	Adobe Systems Software Ireland Limited
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Software Ireland Limited
Adobe Photoshop CS5.1	Adobe Systems Software Ireland Limited
Aequoria Dark Box „HPP-U100“	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH
AnalySIS Get IT Software	Olympus
CCDI Camera EM-CCD Digital Camera „C9100-13 SETA“ mit anwendungsspezifischer GmbH Software	Hamamatsu Photonics Deutschland
Chipcytometry-Fluoreszenzmikroskop-Einheit mit EDV und entsprechender Software	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany
CO ₂ -Inkubator/Brutschrank „Heracell 150 5102279“	Thermo Fisher Scientific Inc.
Elektrophorese-Kammer	Thermo Fisher Scientific Inc.
Fluoreszenzmikroskop „Axiolab HBO 50“ mit anwendungsspezifischer Software	Carl Zeiss AG
GmbH GraphPad Prism Version 5 -9	GraphPad Software
Inverses Mikroskop, Laser-gestützte Schneideapparatur, Fluoreszenzlampe, hochauflösende Mikroskopie-Kamera, Anwendungsspezifische MMI-Software	MMI, Molecular Machines & Industries, Zürich, Swiss. Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Germany.
Kühl/Gefrier Kombi „Comfort“	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank 4°C „Comfort“	Liebherr-International Deutschland GmbH
Ika® Vortexer MS1 Minishaker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Image J 1.51f	National Institute of Health, open source
LightCycler480	Roche Molecular Biochemicals
Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG
Lichtmikroskop „Olympus BH2“	Olympus
Lichtmikroskop „Olympus BX43“	Olympus
Microsoft Excel Professional Plus 2016	Microsoft Corporation
Microsoft® Excel® 2019 MSO	Microsoft Corporation
Microsoft Word Professional Plus 2016	Microsoft Corporation
Microsoft® Word 2019 MSO	Microsoft Corporation
MTP-Reader	Hamamatsu, Herrsching, Germany
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Germany
REAX 2000 Vortexer	Heidolph Instruments
Rotor Gene Q	Series Software Qiagen
Semi Dry Blotter „Trans Blot SD“	Bio-Rad Laboratories GmbH
Shandon Citadel 1000	Thermo Scientific
Shandon Histocentre 2000 Paraffin-Ausgießstation	Thermo Scientific
Sterilbank/Reinraumwerkbank Maxisafe 2000	Thermo Scientific
Thermocycler MJ Research PTC-200 DNA Engine	GMI, Minnesota, USA
Tiefkühlschrank -20°C „Premium“	Liebherr-International Deutschland GmbH
Trockenschrank INB 400 Trockenschrank UE 200 Memmert GmbH + Co. KG	Memmert GmbH + Co. KG
Trockenschrank UE 200	Memmert GmbH + Co. KG

Wasserbad Memmert Typ W350	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Germany
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Lab Technology. Tuttlingen, Germany
Zentrifuge Sprout Mini Centrifuge	Heathrow Scientific, Illinois, USA

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung GATA-3 knock down

Um die Bedeutung von GATA-3 für die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten beurteilen zu können, wurde die GATA-3 Expression in primären humanen Keratinozyten mittels eines lentiviral eingebrachten shRNA-Konstruktes stabil herunterreguliert (gesilenced). Um den bestmöglichen Effekt zu erreichen, wurden zunächst verschiedene shRNAs hinsichtlich ihrer Effektivität verglichen (**Abbildung 11**).

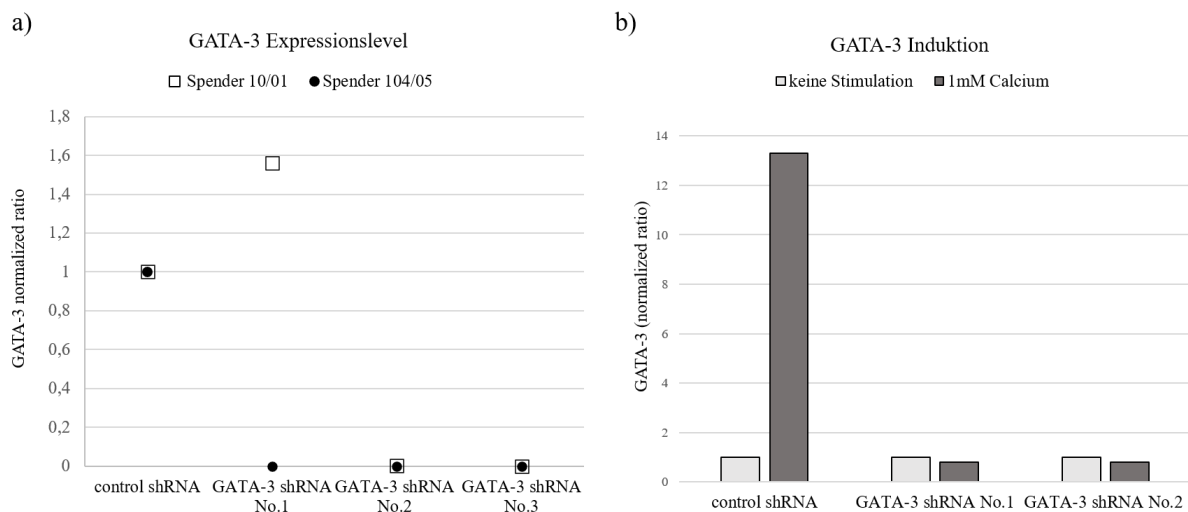


Abbildung 11. Etablierung GATA-3 *knock down* in primären humanen Keratinozyten. a) Einfluss der verschiedenen GATA-3 shRNAs auf die basale Expression von GATA-3. b) Vergleich von GATA-3 shRNA No.1 und No.2 unter 1mM Ca-Behandlung. Auswertung per qRT-PCR. Dargestellt sind die relativen GATA-3 mRNA Level normalisiert auf RPS20.

Der Erfolg des GATA-3 *knock down* wurde mittels Western Blot und qRT-PCR evaluiert. Wie in **Abbildung 11a)** dargestellt, konnte in der qRT-PCR gezeigt werden, dass sich das Expressionslevel von GATA-3 nach der Behandlung mit GATA-3 shRNA No.1-3 von dem der mit control shRNA behandelten Keratinozyten unterschied. Die Keratinozyten, die mit GATA-3 shRNA No.2 und No.3 behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu dem Kontrollansatz mit control shRNA-Behandlung ein deutlich niedrigeres Expressionslevel des Transkriptionsfaktors auf, teilweise lag es unterhalb der Nachweisgrenze. In den mit GATA-3 shRNA behandelten Keratinozyten konnte durch die Stimulation mit Ca^{2+} die GATA-3 Expression nicht mehr induziert werden (**Abbildung 11b)**). Da die Keratinozyten, die mit GATA-3 shRNA No.3 behandelt wurden, unter der lichtmikroskopischen Kontrolle eine veränderte, nicht dem Zelltyp entsprechende physiologische Morphologie aufwiesen und keine Proliferation mehr beobachtet werden konnte, wurde von der weiteren Verwendung der GATA-3 shRNA No.3 abgesehen. Bei der Behandlung mit GATA-3 shRNA No.1 kam es zu Spender-

abhängigen unterschiedlichen Effekten auf die GATA-3 mRNA Level; die Keratinozyten eines Spenders zeigten eine deutliche Zunahme des GATA-3 mRNA Levels, wohingegen die Keratinozyten des anderen Spenders ebenfalls eine gute Herunterregulation der GATA-3 mRNA Level (**Abbildung 11a**)) aufwiesen. Auf Grund der Instabilität des Silencing-Effekts wurde auch diese GATA-3 shRNA nicht weiterverwendet. Die Effekte für die GATA-3 shRNA No. 2 zeigten sich in den Vorversuchen als stabil bei guter physiologischer Morphologie und Proliferation der Zellen. Entsprechend wurde mit dieser shRNA weitergearbeitet und es handelt sich bei der Beschreibung „GATA-3 shRNA“ in dieser Arbeit im Folgenden um die GATA-3 shRNA No.2, wenn nicht anders angegeben.

4.2 Identifizierung von GATA3 abhängigen Targets – Auswertung des Microarray

Der MA wurde zu Beginn dieses Projektes durchgeführt, um eine Übersicht zu erhalten, welche Gene potentiell durch die Expression von GATA-3 beeinflusst werden.

Bei der Auswertung des MA wurden verschiedene Fragestellungen thematisiert. Von besonderem Interesse war für diese Arbeit die Frage, wie sich eine reduzierte GATA-3 Expression auf Gene auswirkt, deren Produkte von zentraler Bedeutung für die epidermale Barriere sind. Zudem sollten Effekte inflammatorischer Konditionen auf die entsprechende Genexpression beurteilt werden. Die Analyse des MA erlaubte neben qualitativen Unterschieden der Genexpression auch eine Quantifizierung der Genexpression unter verschiedenen Konditionen. Quantitative Unterschiede werden über die Intensität des Fluoreszenzsignals ermittelt, welches in der Analyse vorverarbeitet wird.

Die graphische Auswertung stellt die Intensität des *processed signal* dar, deren Größe an der y-Achse den weiter unten aufgeführten Balkendiagrammen zu entnehmen ist. Die relative Auswertung erfolgte über die Berechnung einer Ratio, für die das Signal der mit GATA-3 shRNA behandelten Probe ins Verhältnis zur Kontrollprobe gesetzt wurde:

- *Processed signal* GATA-3 shRNA basal / *Processed signal* control shRNA basal.

Aufgrund der abnehmenden Aussagekraft bei relativ geringer Signalstärke wurden nur Gene berücksichtigt, deren *processed signal* einen Wert >50 betrug.

Die nachfolgende **Tabelle 17** zeigt die Auswertung des MA für ausgewählte Gene, die im Kontext der epidermalen Barriere stehen bzw. als Referenzgen für diese Arbeit relevant sind. Der durchgeführte MA umfasste insgesamt >34.000 Gene. Das Ergebnis aus der Probenanalyse ist komplex. Mehr als 1000 Gene waren durch die Behandlung mit der GATA-3 shRNA im Vergleich zur control shRNA mit einem Faktor ≥ 2 hochreguliert. Weitere 500 Gene wurden durch die lentivirale Transduktion mit GATA-3 shRNA mit einem Faktor ≥ 2 herunterreguliert. Die Ratio entspricht dem Verhältnis von GATA-3 shRNA zu control shRNA. Ergebnisse <1 wurden als Kehrwert angegeben und mit negativem Vorzeichen gekennzeichnet. Auf diese Weise gelingt eine Darstellung im gleich skalierten Wertebereich ober- und unterhalb des Neutralpunktes „1“. Negative Werte beschreiben dementsprechend eine Herunterregulation der

Expression des entsprechenden Genes bei verminderter GATA-3 Expression nach Behandlung durch GATA-3 shRNA.

Für diese Arbeit ist vorrangig das Verhältnis von GATA-3 shRNA zu Kontroll-transduzierten Keratinozyten (control shRNA) unter basalen Konditionen von Interesse, da primär der Einfluss des GATA-3 Silencing auf die mRNA Synthese von primären humanen Keratinozyten untersucht werden sollte.

Neben dem besagten Verhältnis konnten auch die Signalstärken unter anderen experimentellen Konditionen miteinander ins Verhältnis gesetzt werden, möglich waren zudem folgende Kombinationen:

- GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α / control shRNA + IL-22 + TNF α ,
- control shRNA + IL-22 + TNF α / control shRNA basal,
- GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α / GATA-3 shRNA basal.

Tabelle 17 zeigt die Anzahl der regulierten Gene (Faktor ≥ 2 bzw. ≤ -2) unter den alternativen experimentellen Konditionen.

Tabelle 17. Anzahl der hoch- und herunterregulierten Gene unter verschiedenen experimentellen Konditionen.

Microarray; Ratio processed signal	Experimentelle Konditionen	Anzahl hochregulierter Gene mit Faktor ≥ 2	Anzahl herunterregulierter Gene mit Faktor ≤ -2
M4228/M4226; R1	GATA-3 shRNA basal/ control shRNA basal	1564	788
M4229/M4227; R2	GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α / control shRNA + IL-22 + TNF α	950	499
M4227/M4226; R3	control shRNA + IL-22 + TNF α / control shRNA basal	247	117
M4229/M4228; R4	GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α / GATA-3 shRNA basal	272	165

Weitere Fragestellung wäre hier ein Einfluss der inflammatorischen Konditionen auf die Genexpression im Vergleich des GATA-3 *knock down* zu den Kontrollzellen. Diese Arbeit fokussiert sich auf die Geninduktion bzw. -repression durch den GATA-3 *knock down* in Bezug auf Gene, die für die epidermale Barriere von Bedeutung sind.

Im Folgenden wird somit die Ratio von GATA-3 shRNA zu control shRNA unter basalen Bedingungen betrachtet. **Tabelle 18** demonstriert beispielhaft beobachtete Genregulationen.

Tabelle 18. Exemplarische Darstellung der Daten des MA.

Kategorie/ Gen-Name	Ratio M4228/M4226	Processed Signal GATA-3 shRNA	Processed Signal control shRNA
Silencing-Effekt			
<i>GATA-3</i>	-2,0	2335	4783
Differenzierungsmarker			
<i>FLG</i>	-2,5	1914	4768
<i>FLG2</i>	1,1	77551	71307
<i>IVL</i>	-1,4	94304	129024
<i>LOR</i>	-1,8	107607	195943
Lipidbiosynthese			
<i>AGPAT5</i>	1,3	2474	1976
<i>AGPAT6</i>	-1,9	966	1827
S100-Proteine			
<i>S100A8</i>	1,5	524208	343631
<i>S100A9</i>	1,7	78690	46846
<i>S100A10</i>	2,1	234422	113098
<i>S100A12</i>	2,8	5020	1794
FLG-prozessierende Enzyme			
<i>FURIN</i>	-1,7	369	621
<i>CAPN1</i>	-1,5	7332	10933
<i>CAPN10</i>	-1,6	189	116
Kallikrein			
<i>KLK1</i>	1,7	562	327
ribosomale Proteine / Haushaltsgene			
<i>ACTB</i>	-1,8	76746	138880
<i>GAPDH</i>	-1,0	185249	194465
<i>PGK-1</i>	-1,0	148788	151625
<i>RN28S1</i>	135,3	145181	1073
<i>RPS20</i>	2,0	389296	196431

4.2.1 Effekt des GATA-3 Silencing

Die lentivirale Transduktion mit GATA-3 shRNA führte erwartungsgemäß zu reduzierten mRNA Gehalten des Transkriptionsfaktors (**Abbildung 12**). Die Ratio der prozessierten Signalstärke wurde von Zellen mit GATA-3 *knock down* zu Kontrollzellen mit -2,0 bestimmt. Zusätzlich war der Effekt der inflammatorischen Kondition (d.h. der Einfluss von IL-22 und TNF α) auf die GATA-3 Expression beurteilbar. Hier zeigte sich eine noch stärkere Reduktion des GATA-3 Levels im Vergleich zur entsprechenden Probe unter basalen Bedingungen (-2,8). Eine weitere Optimierung der Zytokin-Stimulation erfolgt in anschließenden Versuchen, siehe **Kapitel 4.3.2**.

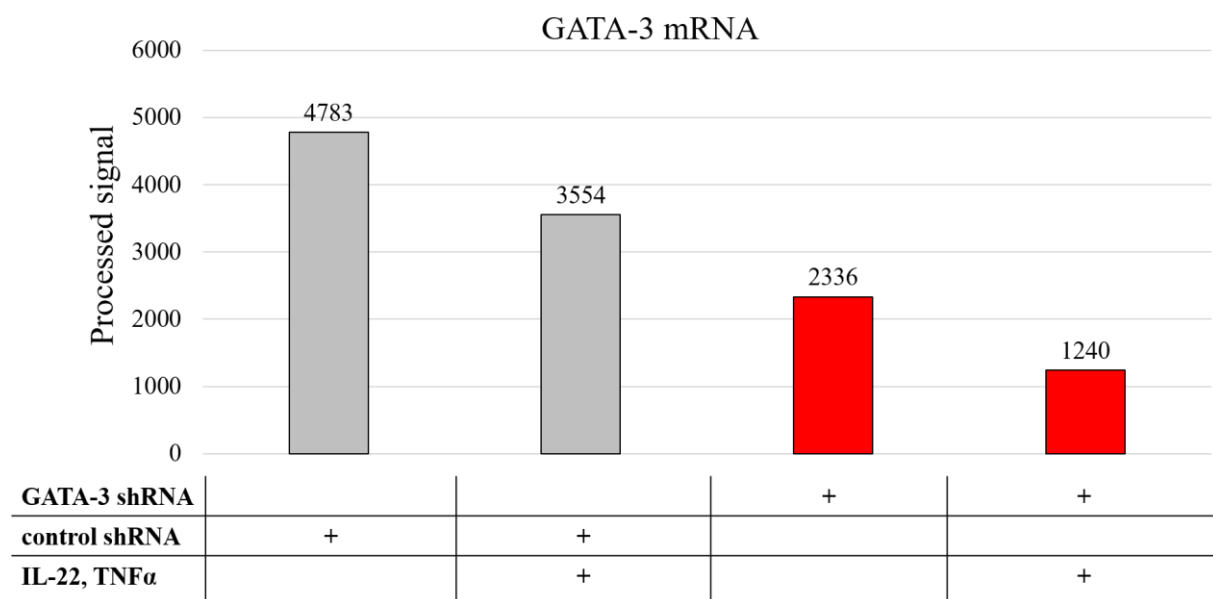


Abbildung 12. Reduktion der GATA-3 mRNA durch lentivirales Silencing. Unter allen dargestellten Konditionen waren die Keratinozyten für 5d mit 2mM Ca²⁺ differenziert worden. Die Zytokinstimulation erfolgte für 4h (IL-22, TNF α je 10ng/ml). Gezeigt wird die prozessierte Signalstärke der GATA3 mRNA, detektiert mittels MA.

Tabelle 19. GATA-3 mRNA Gehalte: Ermittelte Ratio aus den prozessierten Signalstärken für die entsprechende Kondition.

Kondition	Ratio GATA-3
GATA-3 shRNA basal/control shRNA basal	-2,0
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA + IL-22 + TNF α	-2,8
control shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA basal	-1,4
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /GATA-3 shRNA basal	-1,9

4.2.2 Einfluss der GATA-3 Expression auf die Differenzierungsmarker

Die herausragende Bedeutung der Proteine des *late cornified envelope* für die Barrierefunktion der Haut, insbesondere auch unter dem Aspekt chronisch entzündlicher Hautkrankheiten, ist bekannt. Dementsprechend fokussiert sich diese Arbeit auf wichtige Differenzierungsmarker des CE sowie FLG als Vertreter einer weiteren Gruppe des *epidermal differentiation complex*.

4.2.2.1 Genregulation von Filaggrin bei GATA-3-Defizienz

Es zeigte sich basal eine 2,5-fache Herunterregulation der FLG mRNA bei Behandlung der Zellen mit GATA-3 shRNA im Vergleich zu den mit control shRNA behandelten Zellen (**Abbildung 13**). Im Vergleich zu anderen Differenzierungsmarkern wie IVL und LOR, erfuhr FLG die stärkste Regulation durch GATA-3 Silencing. Ein zusätzlicher Effekt der inflammatorischen Kondition (d.h. unter Einfluss von IL-22 und TNF α) auf die Expression der FLG mRNA war weder bei den Kontrollzellen noch bei den Zellen mit GATA-3 knock down zu beobachten (Ratio -1,1 bzw. 1,3). Im Vergleich der Kontrollzellen zu den GATA-3 gesilenceten Zellen fiel die Herunterregulation von FLG mRNA unter inflammatorischen Konditionen weniger stark aus als zu basalen Konditionen (Ratio -1,7).

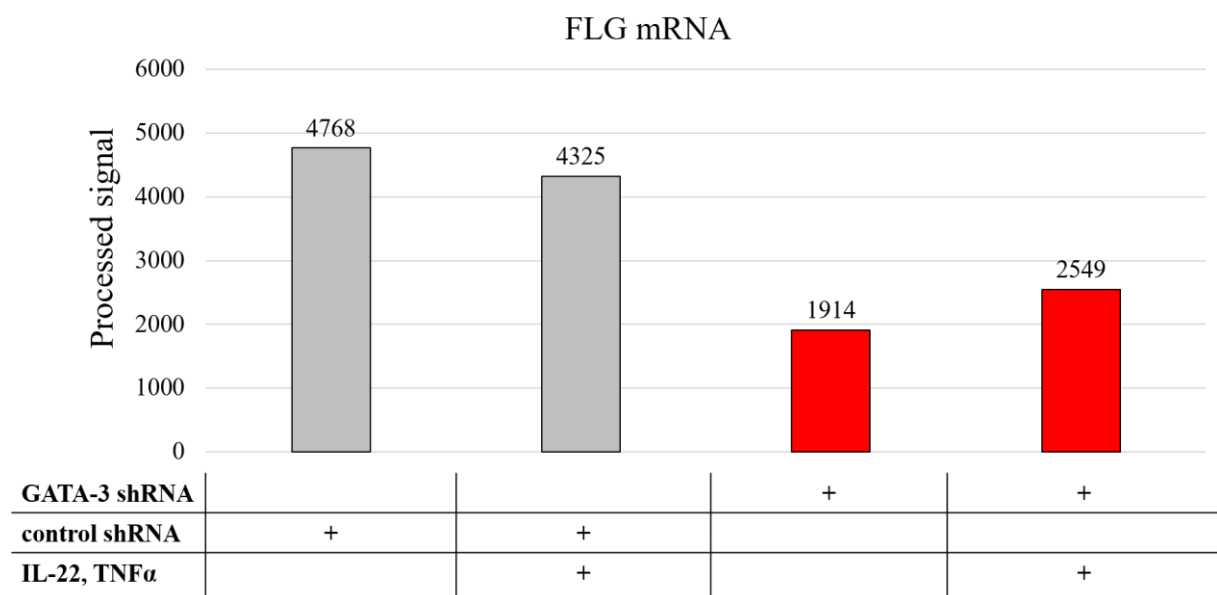


Abbildung 13. Reduzierte FLG mRNA Gehalte nach GATA-3 *knock down*. Unter allen dargestellten Konditionen waren die Keratinozyten für 5d mit 2mM Ca²⁺ differenziert worden. Die Zytokinstimulation erfolgte für 4h (IL-22, TNF α je 10ng/ml). Gezeigt wird die prozessierte Signalstärke der FLG mRNA, detektiert mittels MA.

Tabelle 20. FLG mRNA Gehalte: Ermittelte Ratio aus den prozessierten Signalstärken für die entsprechende Kondition.

Kondition	Ratio FLG
GATA-3 shRNA basal/control shRNA basal	-2,5
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA + IL-22 + TNF α	-1,7
control shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA basal	-1,1
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /GATA-3 shRNA basal	1,3

4.2.2.2 Genregulation von Loricrin bei GATA-3-Defizienz

Auf mRNA-Ebene erfuhr LOR durch GATA-3 Silencing eine Herunterregulation um den Faktor 1,8 (**Tabelle 21**). In den Keratinozyten der Kontrolle zeigte sich unter inflammatorischen Konditionen (TNF α und IL-22) ein deutlich negativ regulatorischer Effekt auf die Expression von LOR (Ratio -1,8, **Abbildung 14**). Die gleiche Zytokin-Stimulation hatte keinen Effekt auf die LOR-Expression in GATA-3 gesilencierten Zellen (Ratio 1,1). Unter inflammatorischen Konditionen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Expression von LOR mRNA im Vergleich der Kontrollzellen zu den Zellen mit GATA-3 *knock down* (Ratio 1,0),

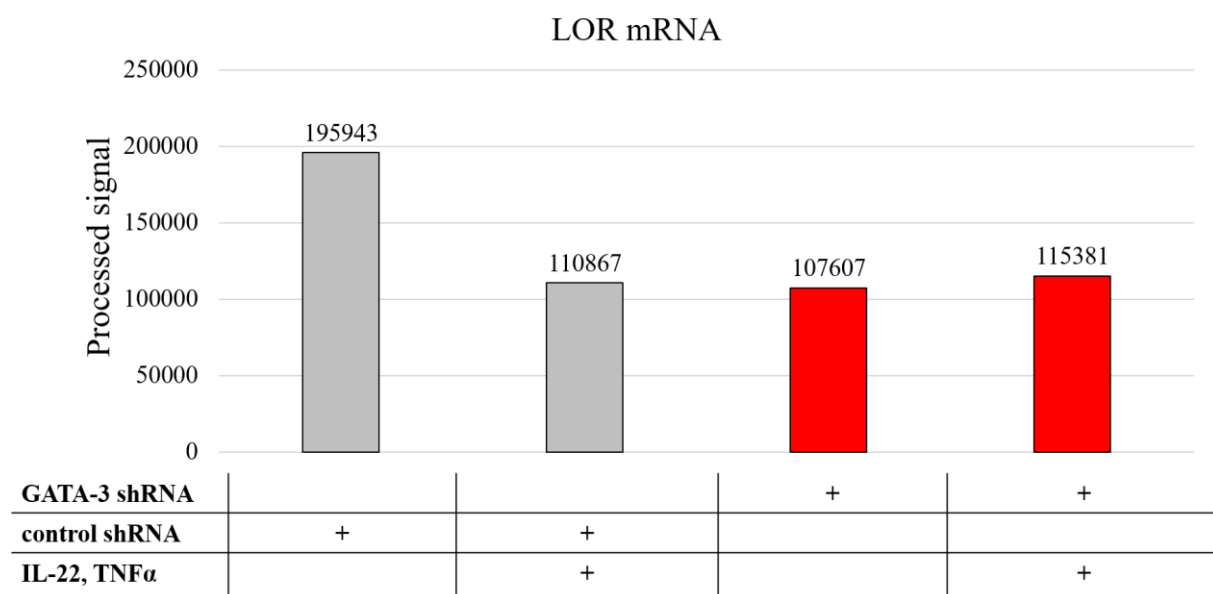


Abbildung 14. LOR mRNA Gehalte nach GATA-3 *knock down*. Unter allen dargestellten Konditionen waren die Keratinozyten für 5d mit 2mM Ca²⁺ differenziert worden. Die Zytokinstimulation erfolgte für 4h (IL-22, TNF α je 10ng/ml). Gezeigt wird die prozessierte Signalstärke der LOR mRNA, detektiert mittels MA.

Tabelle 21. LOR mRNA Gehalte: Ermittelte Ratio aus den prozessierten Signalstärken für die entsprechende Kondition.

Kondition	Ratio LOR
GATA-3 shRNA basal/control shRNA basal	-1,8
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA + IL-22 + TNF α	1,0
control shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA basal	-1,8
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /GATA-3 shRNA basal	1,1

4.2.2.3 Genregulation von Involucrin bei GATA-3-Defizienz

Unter reduzierter GATA-3 Expression zeigte sich ebenfalls ein negativ regulatorischer Effekt um den Faktor 1,4 auf die Expression von IVL (**Abbildung 15**). Im Vergleich zu FLG und LOR war die Regulation relativ betrachtet weniger stark (Ratio -1,4; vgl. FLG: -2,5; LOR: -1,8 (**Tabelle 20**, **Tabelle 21**, **Tabelle 22**)). Die Stimulation mit IL-22 und TNF α hatte weder in Kontrollzellen noch in mit GATA-3 shRNA transduzierten Keratinozyten einen eindeutigen Effekt auf die Expression von IVL (Ratio -1,1 bzw. 1,1). Unter inflammatorischen Konditionen zeigte sich ebenfalls nur ein geringer Effekt des GATA-3 *knock down* auf die IVL mRNA Gehalte verglichen mit Kontrollzellen (Ratio -1,2, **Tabelle 22**).

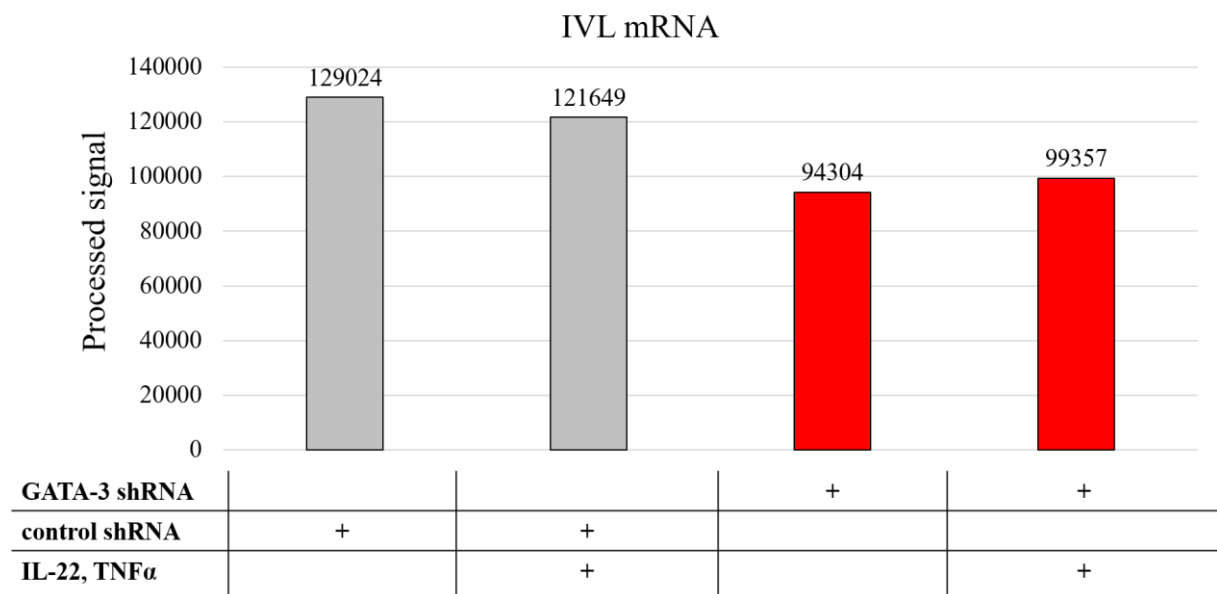


Abbildung 15. GATA3 *knock down* zeigt einen negativ regulatorischen Effekt auf die IVL Expression. Unter allen dargestellten Konditionen waren die Keratinozyten für 5d mit 2mM Ca²⁺ differenziert worden. Die Zytokinstimulation erfolgte für 4h (IL-22, TNF α je 10ng/ml). Gezeigt wird die prozessierte Signalstärke der IVL mRNA, detektiert mittels MA.

Tabelle 22. IVL mRNA Gehalte: Ermittelte Ratio aus den prozessierten Signalstärken für die entsprechende Kondition.

Kondition	Ratio IVL
GATA-3 shRNA basal/control shRNA basal	-1,4
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA + IL-22 + TNF α	-1,2
control shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA basal	-1,1
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /GATA-3 shRNA basal	1,1

4.2.3 Einfluss der GATA-3 Expression auf die Lipidregulation

Die Behandlung mit GATA-3 shRNA hatte des Weiteren einen Effekt auf zahlreiche Gene, die an der Lipidsynthese und -prozessierung beteiligt sind. Unter anderem war die Expression des für das Enzym 1-Acylglycerol-3-Phosphate-O-Acyltransferase-6 (AGPAT6) exprimierenden Genes auf mRNA Ebene betroffen (**Abbildung 16**). AGPAT6 dient als Katalysator für die Umwandlung von Lysophosphatidsäure (LPA) zu Phosphatidsäure (PA). Eine Rolle in diversen Epithelien wird diskutiert [249–251]. Der *knock down* von GATA-3 mittels shRNA führt zu einer reduzierten Expression von AGPAT6 (Ratio -1,9, **Tabelle 23**). Die inflammatorischen Konditionen führten sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Zellen mit GATA-3 *knock down* zu einer Induktion der AGPAT6 mRNA, wobei diese in letzteren stärker ausfiel (Ratio 1,2 vs. 1,6). Die Herunterregulation der AGPAT6 mRNA fiel unter inflammatorischen Konditionen in den Keratinozyten mit GATA-3 *knock down* weniger stark aus als unter basalen Konditionen (Ratio -1,4).

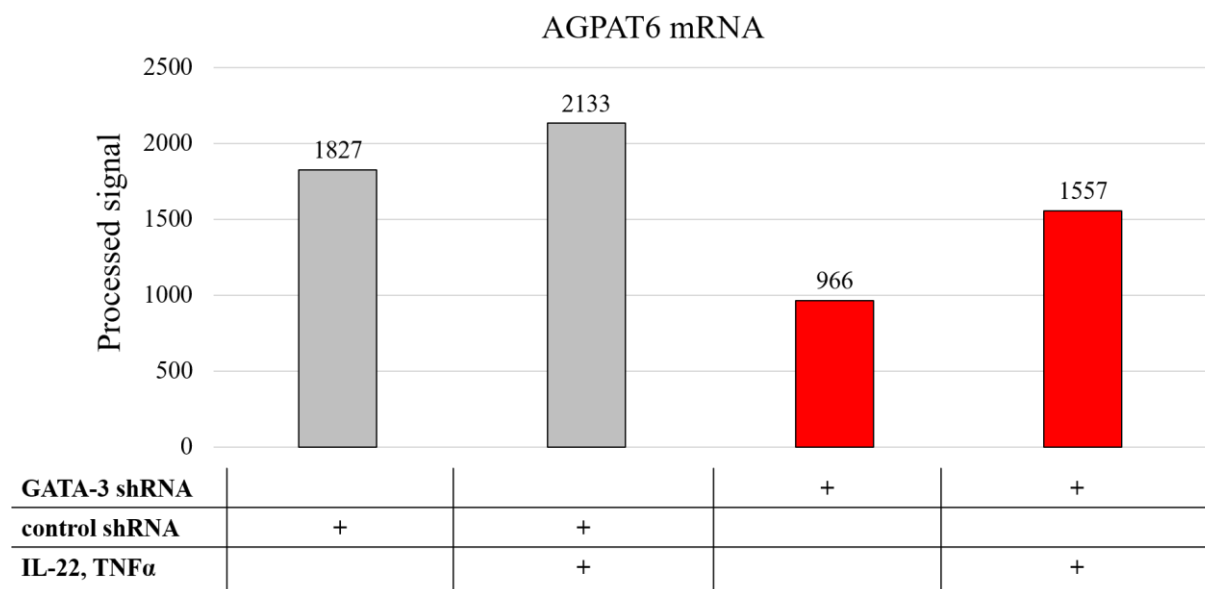


Abbildung 16. AGPAT mRNA Gehalte nach GATA-3 *knock down*. Unter allen dargestellten Konditionen waren die Keratinozyten für 5d mit 2mM Ca²⁺ differenziert worden. Die Zytokinstimulation erfolgte für 4h (IL-22, TNFα je 10ng/ml). Gezeigt wird die prozessierte Signalstärke der AGPAT6 mRNA, detektiert mittels MA.

Tabelle 23. AGPAT6 mRNA Gehalte: Ermittelte Ratio aus den prozessierten Signalstärken für die entsprechende Kondition.

Kondition	Ratio AGPAT6
GATA-3 shRNA basal/control shRNA basal	-1,9
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNFα/control shRNA + IL-22 + TNFα	-1,4
control shRNA + IL-22 + TNFα/control shRNA basal	1,2
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNFα/GATA-3 shRNA basal	1,6

4.2.4 Einfluss der GATA-3 Expression auf Mitglieder der S100-Protein-Familie

Zu den zahlreichen bekannten Funktionen der Mitglieder der S100-Protein-Familie zählt unter anderem die Regulation und Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase.

Durch Stimulation mit TNF α und IL-22 war eine Induktion der Genexpression von S100A12 auf mRNA Ebene um den Faktor 1,5 zu beobachten, siehe **Abbildung 17** und **Tabelle 24**. In den Keratinozyten mit GATA-3 *knock down* konnte dieser Effekt nicht demonstriert werden (Ratio 1,1). Das GATA-3 Silencing führte unter basalen Bedingungen zur deutlichen Heraufregulation von S100A12 mRNA im Vergleich zu Kontrollzellen (Ratio 2,8), auch unter inflammatorischen Konditionen (Stimulation mit IL-22 und TNF α) zeigte sich eine Induktion von S100A12 mRNA in GATA-3 gesilencierten Keratinozyten.

Durch GATA-3 Silencing erfuhr die Expression von S100A10 auf mRNA Ebene unter basalen Konditionen eine Heraufregulation (Ratio 2,1), dieser Effekt kam auch unter inflammatorischen Konditionen zur Demonstration (Ratio 1,6). Der Einfluss der Stimulation mit IL-22 + TNF α zeigte in den Kontrollzellen a.e. keinen relevanten Effekt (Ratio 1,1), auch in den GATA-3 gesilencierten Keratinozyten ließ sich ebenfalls eher kein relevanter Effekt demonstrieren (Ratio -1,2).

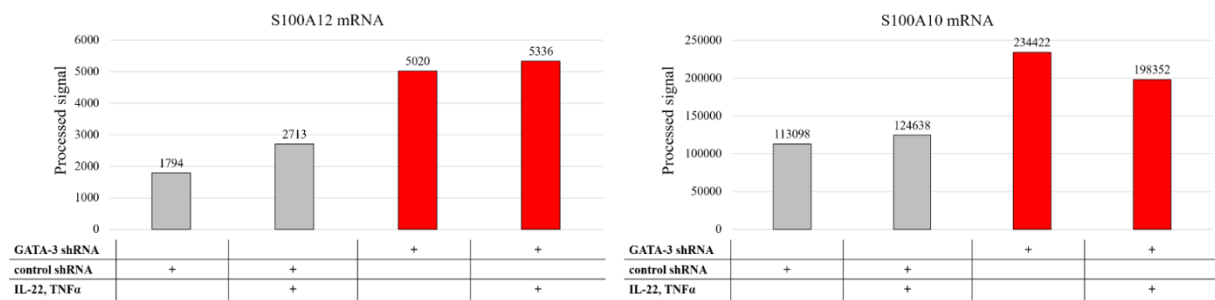


Abbildung 17. Vermehrte Expression von S100A12 und S100A10 in Keratinozyten mit GATA-3 *knock down*. Unter allen dargestellten Konditionen waren die Zellen für 5d mit 2mM Ca²⁺ differenziert worden. Die Zytokinstimulation erfolgte für 4h (IL-22, TNF α je 10ng/ml). Gezeigt wird die prozessierte Signalstärke der jeweiligen mRNA, detektiert mittels MA.

Tabelle 24. mRNA Gehalte von S100A12 und S100A10: Ermittelte Ratio aus den prozessierten Signalstärken für die entsprechende Kondition.

Kondition	Ratio S100A12	Ratio S100A10
GATA-3 shRNA basal/control shRNA basal	2,8	2,1
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA + IL-22 + TNF α	2,0	1,6
control shRNA + IL-22 + TNF α /control shRNA basal	1,5	1,1
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNF α /GATA-3 shRNA basal	1,1	-1,2

4.3 Referenzgene – Einfluss der GATA-3 shRNA auf die Expression der housekeeping genes

Um für die fortführenden Analysen ein geeignetes *housekeeping gene* (HKG) als Referenzgen zu wählen, wurden verschiedene geläufige HKGs im MA betrachtet [252, 253]. Die Ergebnisse für Phosphoglyceratkinase-1 (PGK1), β -Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und *ribosomal protein S20* (RPS20) sind in **Abbildung 18** dargestellt.

Die Ergebnisse des MA zeigten eine Induktion der mRNA von RPS20 in Keratinozyten, die mit der GATA-3 shRNA transduziert wurden (Ratio 2,0). β -Aktin mRNA hingegen wurde in den mit GATA-3 shRNA behandelten Keratinozyten deutlich weniger exprimiert (Ratio -1,8). Es ist somit als Referenzgen ebenfalls eher fehleranfällig. Für GAPDH (Ratio -1,0) und PGK-1 (Ratio -1,0) zeigte sich die mRNA Expression durch die Modulation der GATA-3 Genexpression nicht beeinflusst.

Die Expression von PGK-1 war im MA weder durch die Stimulation mit den Zytokinen IL-22 und TNF α (Ratio -1,1) noch durch die Behandlung mit der GATA-3 shRNA in relevantem Maße reguliert (Ratio -1,0), siehe **Abbildung 18a**. Die Expression von GAPDH zeigte sich unter Zytokinstimulation (Ratio -1,2 [Kontrollzellen] bzw. Ratio -1,1 [GATA-3 *knock down*]) ebenfalls eher stabil.

Die Zytokinstimulation induzierte hingegen eine deutliche Zunahme der RPS20 und β -Aktin mRNA (Ratio 1,7 bzw. Ratio -1,4).

Insgesamt zeigten sich GAPDH und PGK-1 als Referenzgene unter modulierter GATA-3 Genexpression und inflammatorischen Konditionen stabiler als RPS20 und β -Aktin.

Die Validierung der Expression des Referenzgens erfolgte mittels qRT-PCR, siehe **Kapitel 4.3.1**.

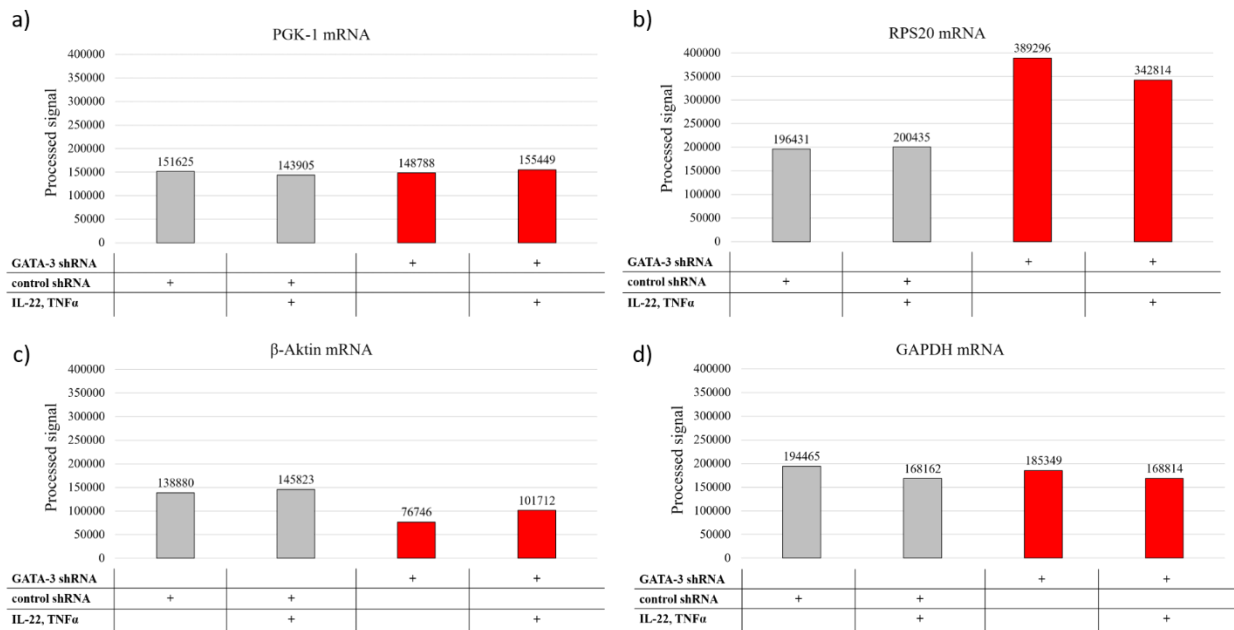


Abbildung 18. Einfluss des GATA-3 *knock down* auf die Expression verschiedener geläufiger HKG. Unter allen dargestellten Konditionen waren die Keratinozyten für 5d mit 2mM Ca^{2+} differenziert worden. Die Zytokinstimulation erfolgte für 4h (IL-22, TNFα je 10ng/ml). Gezeigt wird die prozessierte Signalstärke der jeweiligen mRNA, detektiert mittels MA.

Tabelle 25. mRNA Gehalte der HKG: Ermittelte Ratio aus den prozessierten Signalstärken für die entsprechende Kondition.

Kondition	Ratio PGK-1	Ratio RPS20	Ratio β-Aktin	Ratio GAPDH
GATA-3 shRNA basal/ control shRNA basal	-1,0	2,0	-1,8	-1,0
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNFα/control shRNA + IL-22 + TNFα	1,1	1,7	-1,4	1,0
control shRNA + IL-22 + TNFα/control shRNA basal	-1,1	1,0	1,0	-1,2
GATA-3 shRNA + IL-22 + TNFα/GATA-3 shRNA basal	1,0	-1,1	1,3	-1,1

4.3.1 Auswahl des HKG mittels qRT-PCR unter Stimulationsbedingungen

An Keratinozyten von zwei Spendern wurde die Expression der HKGs RPS20 und PGK-1 unter verschiedenen Stimulationsbedingungen in der qRT-PCR betrachtet. Es sollte beurteilt werden, welchen Einfluss die verschiedenen inflammatorischen Konditionen sowie die Induktion der Differenzierung durch Calcium auf die Expression verschiedener HKG haben. Unter dieser Fragestellung wurden die CP-Werte (*crossing point*, *threshold point*) zweier Haushaltsgene unter den beschriebenen Konditionen verglichen, siehe **Abbildung 19**. Etwaige Einflüsse der inflammatorischen Stimulationen auf die mRNA Gehalte wurden anhand der Standardabweichung evaluiert.

Die Standardabweichung (SD) zeigte für die inflammatorischen Konditionen keine relevante Einflussnahme auf die Expression der Gene RPS20 und PGK-1 (RPS20 SD=0,489; PGK1 SD=0,779). In Bezug auf PGK-1 zeigte sich eine etwas größere Streuung um den Mittelwert bei Spender 20/07 (PGK-1 SD=0,74; RPS20 SD=0,35). Spender 08/05 zeigte eine kleinere Streuung um den Mittelwert verglichen mit RPS20 (PGK-1 SD=0,30; RPS20 SD=0,39).

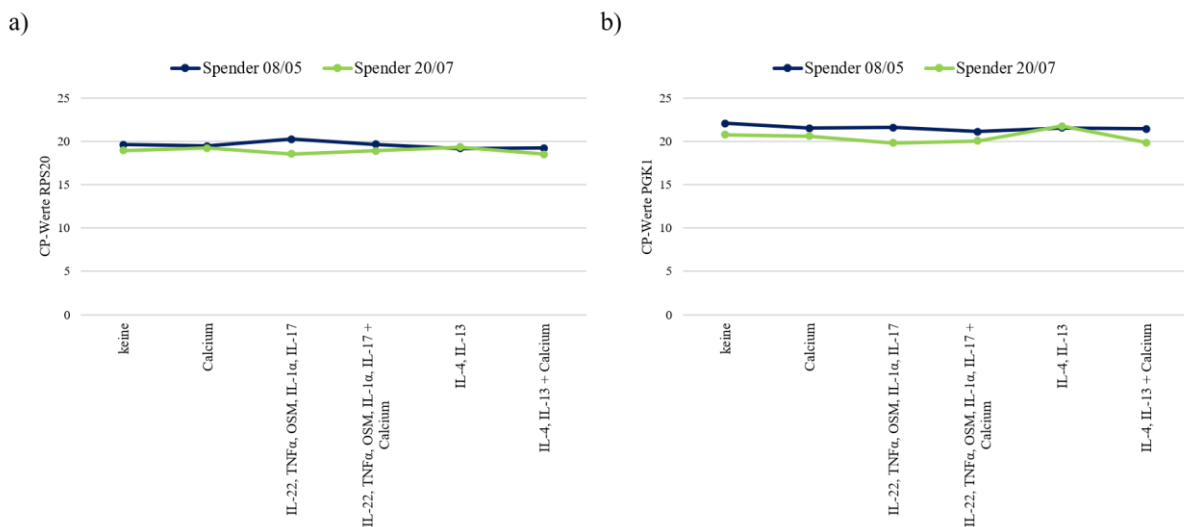


Abbildung 19. Vergleich der CP-Werte der HKGs (a) RPS20 und (b) PGK-1 unter verschiedenen inflammatorischen Konditionen. Gezeigt sind die mittels qRT-PCR ermittelten CP-Werte nicht-transduzierter Keratinozyten. Die Stimulation erfolgte über jeweils 72h mit den angegebenen Zytokinen (IL-22 (10 ng/ml), TNFα (10 ng/ml), OSM, (25 ng/ml), IL-1α (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml), IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml) +/- 1,3mM Ca²⁺ Stimulation, ebenfalls über 72h. N= 2.

Da für den MA GATA-3 gesilencte Zellen verwendet wurden, besteht hier nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit. Der MA zeigte eine stabilere konstitutive Expression von PGK-1 speziell für die mit *nonsense* und GATA-3 shRNA transduzierten Keratinozyten. RPS20 mRNA wurde unter modulierter GATA-3 Expression induziert. Da die Auswirkungen

des Silencing-Effektes auf die Expression des Referenzgens möglichst gering sein sollten, wurde in Zusammenschau der Analyse des MA sowie der qRT-PCR im weiteren Verlauf PGK-1 (Phosphoglyceratkinase-1) als Haushaltsgen verwendet.

4.3.2 Einfluss von inflammatorischen Konditionen in der Zellkultur auf GATA-3 Expression

Die Stimulation mit den hier verwendeten Zytokinen diente der Simulation eines Psoriasis- bzw. AD-assozierten Entzündungsmilieus. Die Kombination Th1/Th17-assoziierter Zytokine führte zu einer effektiven Herunterregulation von GATA-3 unter einer „Psoriasis“ assoziierten Kondition. Am effektivsten erfolgte dies durch die zeitgleiche Stimulation der Keratinozyten mit IL-22, TNF α , OSM und IL-17. Diese Konditionen wurden für alle folgenden Versuche verwendet und im Folgenden in dieser Arbeit als Psoriasis-ähnliche Bedingungen betitelt. Die Induktion von GATA-3 gelang indes durch die Th2-spezifischen Zytokine IL-4 und IL-13. Die Stimulation mit IL-4 und IL-13 wurde daher als AD-ähnliche Kondition für die weiteren Versuche in dieser Arbeit ausgewählt.

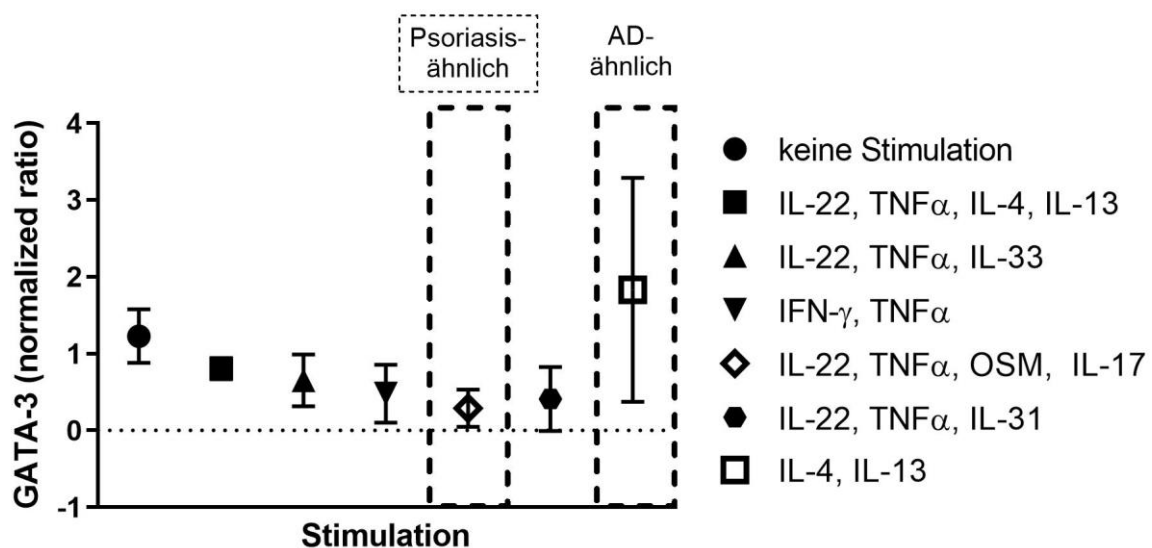


Abbildung 20. GATA-3 Expression unter pro-inflammatorischen Konditionen. Dargestellt sind die Ergebnisse der qRT-PCR nicht-transduzierter Keratinozyten, die mit Beginn der Konfluenz für einen Zeitraum von 3d wie angegeben stimuliert wurden (IL-22 (10 ng/ml), TNF α (10 ng/ml), OSM (25 ng/ml), IL-1 α (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml), IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml). N=3-5).

Um einen möglichst starken Effekt auf die GATA3 Expression ausüben zu können, wurde die Stimulationsdauer optimiert, indem ein Zeitverlauf durchgeführt wurde. Nach jeweils 24h, 3d und 5d wurden die GATA-3 mRNA-Gehalte per qRT-PCR bestimmt, siehe **Abbildung 21**.

Stimuliert wurde mit Psoriasis- und AD-ähnlichen Konditionen (IL-22, TNF α , OSM und IL-17 bzw. IL-4, IL-13). Die Stimulation für 3 Tage zeigte am deutlichsten, dass GATA-3 unter Psoriasis-ähnlichen Bedingungen in der Expression vermindert ist. Im Vergleich zu den nicht-stimulierten Keratinozyten der 3-Tage-Werte war der GATA-3-Gehalt um mehr als die Hälfte reduziert. Es fällt auf, dass nach 24h die Reduktion von GATA-3 im Verhältnis zur unstimulierten Probe um einen kleineren Faktor stattfand. Nach 5-tägiger Stimulation hingegen wird GATA-3 durch die Psoriasis-ähnlichen Bedingungen nicht mehr stabil supprimiert. Die durch die Stimulation mit IL-4 und IL-13 erhöhte Expression von GATA-3 zeigte dagegen für alle gewählten Zeitpunkte einen vergleichbaren Effekt.

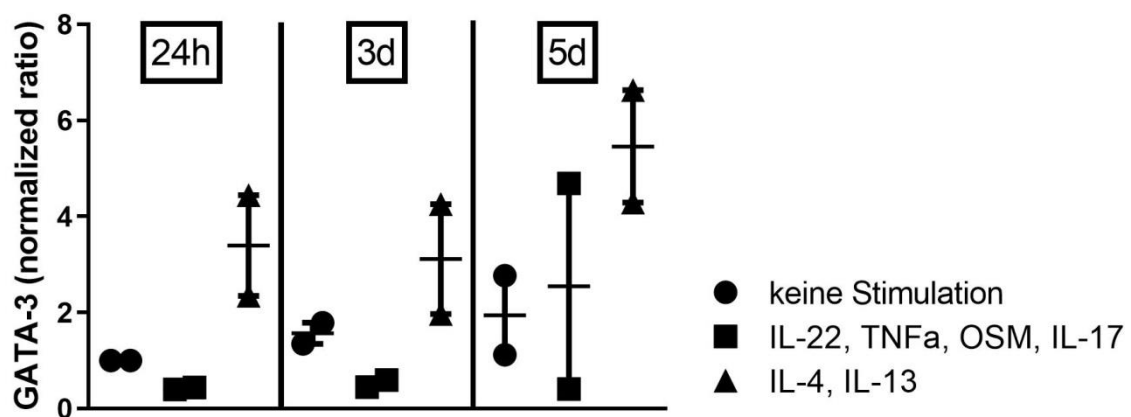


Abbildung 21. Stimulation von Keratinozyten unter inflammatorischen Konditionen im Zeitverlauf. Stimulation zum Beginn der Konfluenz (Zellen zu 75-100% konfluent). Die Keratinozyten wurden nach 24h, 3d und 5d lysiert. GATA-3 mRNA über qRT-PCR ermittelt, normalisiert via PGK-1. N=2 (nicht-transduzierte Zellen).

4.3.3 Expression von GATA-3 unter entzündlichen Bedingungen in transduzierten Keratinozyten

GATA-3 shRNA behandelte Keratinozyten zeigten auf mRNA Ebene nicht nur unter basalen Bedingungen, sondern auch unter Psoriasis- und AD-ähnlichen Konditionen eine geringere GATA3 Expression als die nicht transduzierten Zellen oder die Kontrollzellen (control shRNA), siehe **Abbildung 22**. Unter AD-ähnlichen Konditionen konnte eine signifikante Herunterregulation ($p=0,0313$) erzielt werden. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen somit wie der MA eine Reduktion der GATA-3 Expression durch die lentivirale Transduktion mit GATA-3 shRNA, vergleiche **Abbildung 11**. Durch die Stimulation mit Zytokinen, die ein Psoriasis-ähnliches Milieu erzeugten, wurde die Expression von GATA-3 supprimiert. Den Angaben der Literatur entsprechend konnte GATA-3 durch Stimulation mit IL-4 und IL-13 (AD-ähnliche Konditionen) induziert werden. Trotz Silencing ist die Induktion des Transkriptionsfaktors weiterhin möglich.

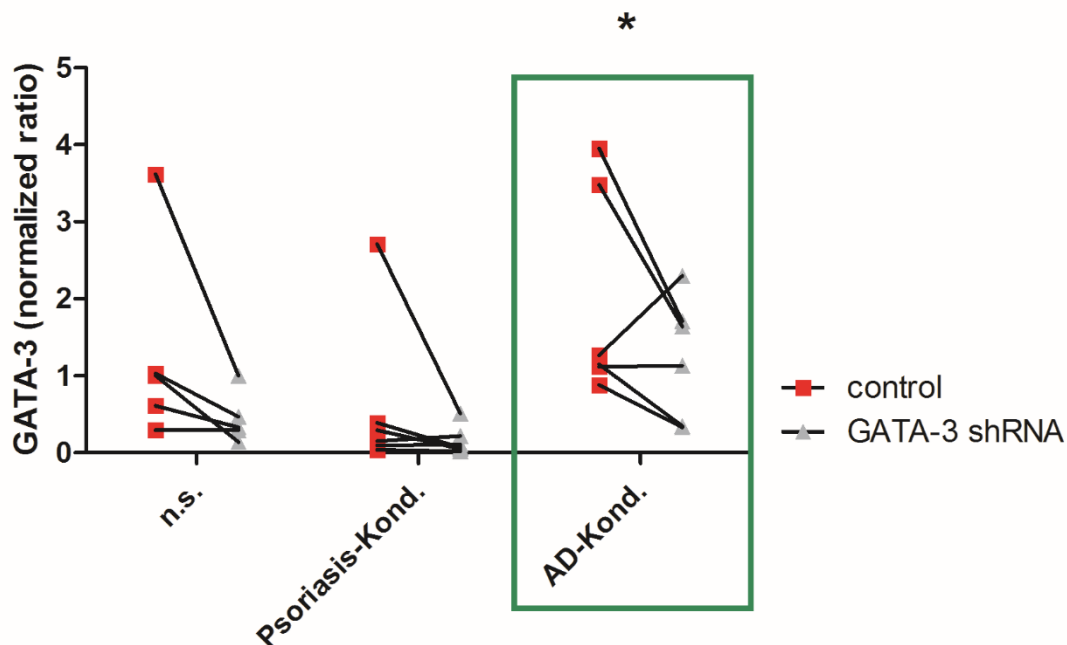


Abbildung 22. GATA3 shRNA behandelte Keratinozyten zeigen auch unter inflammatorischen Konditionen verminderte GATA3 mRNA Gehalte. Gezeigt werden qRT-PCR Daten von unstimulierten und stimulierten Keratinozyten, die entweder mit GATA3 shRNA oder einer nonsense shRNA (control) behandelt wurden. Psoriasis-ähnliche Konditionen: TNF α (10 ng/ml), IL-22 (10 ng/ml), OSM (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml). AD-ähnliche Konditionen: IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml). Stimuliert wurde für je 72h zum Zeitpunkt einer Konfluenz von etwa 75%. N = 6. Normalisiert auf PGK-1. Der Test auf Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Signifikanz wie folgt gekennzeichnet: *p < 0,05.

Tabelle 26. Prozentuale Darstellung der GATA-3 mRNA Regulation unter Psoriasis- und AD-Kondition. 100% entspricht jeweils dem Expressionslevel der nicht mit Zytokin stimulierten Keratinozyten der Kontrollzellen bzw. unter GATA-3 knock down.

Spender	Control shRNA		GATA-3 shRNA	
	Psoriasis-Kondition	AD-Kondition	Psoriasis-Kondition	AD-Kondition
17/09	25%	184%	67%	342%
11/05	33%	433%	36%	780%
104/04	29%	338%	11%	349%
25/07	39%	88%	50%	236%
02/07	75%	109%	51%	171%

4.4 Effekte von GATA3 auf Marker-Gene der epidermalen Barriere

4.4.1 Validierung der Microarray Daten mittels qRT-PCR

Die Ergebnisse des mRNA Microarray wurden für FLG, LOR und IVL auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR validiert. Da der Mikroarray mit gepoolten Proben zweier Spender durchgeführt wurde, ist die allgemeingültige Aussagekraft dieser Daten eingeschränkt. Um die Ergebnisse des Mikroarrays zu bestätigen, ist somit die Überprüfung einer größeren Fallzahl notwendig. Hierfür wurde die qRT-PCR als Methode gewählt. Zusätzlich wurde die Expression der Differenzierungsmarker unter Psoriasis- und AD-ähnlichen Konditionen mittels qRT-PCR betrachtet, um den Einfluss inflammatorischer Konditionen (Psoriasis- bzw. AD-ähnlich) auf die Genexpression, speziell im Vergleich zwischen Kontrollzellen und GATA-3 gesilencten Keratinozyten, zu demonstrieren.

4.4.1.1 Filaggrin mRNA in Kontroll- und GATA-3 gesilenceten Zellen unter entzündlichen Bedingungen

Die Expression der FLG mRNA wurde unter optimierten Versuchsbedingungen mittels qRT-PCR untersucht. Wie in den vorherigen Kapiteln aufgeführt, bedeutet dies, dass sowohl Konfluenzstadium, Zeitpunkt sowie Dauer der Stimulation zuvor evaluiert wurden.

Abbildung 23 und **Tabelle 27** zeigen insgesamt sowohl in den Kontroll- als auch den GATA-3 gesilenceten Keratinozyten unter den beiden gewählten inflammatorischen Konditionen eine Reduktion der basalen FLG mRNA Level. Die Kontrollzellen zeigten unter Psoriasis-ähnlichen Konditionen ein auf 1% des Ausgangslevels reduziertes FLG-mRNA Level (Median). Unter AD-ähnlichen Konditionen lag das FLG mRNA-Level bei 53% (Median). Die GATA-3 gesilenceten Keratinozyten zeigten unter Psoriasis ähnlichen-Konditionen im Durchschnitt keine nachweisbare Expression mehr (Median 0%). Unter AD ähnlichen-Konditionen zeigte sich das FLG-Level verglichen mit basalen Bedingungen auf 41% reduziert.

Unter basalen Konditionen zeigte sich unter modulierter GATA-3 Expression eine Tendenz zur Repression des FLG im Vergleich zu den Kontrollzellen ($p=0,2005$).

Psoriasis-Konditionen führten zu einer maximalen Repression von FLG, so dass zwischen Kontrollzellen und GATA-3 gesilenceten Zellen kein relevanter Unterschied zu demonstrieren war ($p=0,0625$ bzw. $p=0,1250$).

Unter AD-ähnlichen Konditionen war die Expression von FLG in den GATA-3 gesilenceten Keratinozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant herunterreguliert ($p=0,02$).

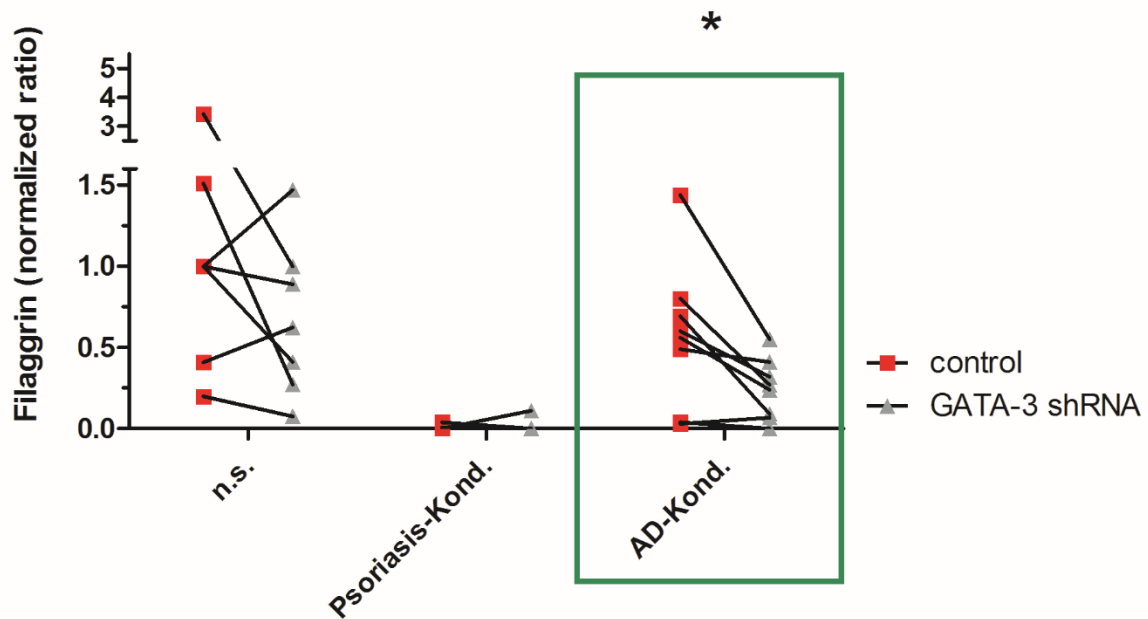


Abbildung 23. Verminderte FLG mRNA Gehalte in GATA3 gesilenceten primären humanen Keratinozyten. Gezeigt werden qRT-PCR Daten von unstimulierten und stimulierten Keratinozyten, die entweder mit GATA3 shRNA oder einer nonsense shRNA (control) behandelt wurden. Psoriasis-ähnliche Konditionen: $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml), IL-22 (10 ng/ml), OSM (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml). AD-ähnliche Konditionen: IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml). Stimuliert wurde für je 72h zum Zeitpunkt einer Konfluenz von etwa 75%. N = 8. Normalisiert auf PGK-1. Der Test auf Signifikanz wurde für die Psoriasis-ähnlichen Konditionen mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt, für die basalen Bedingungen und die AD-ähnlichen Konditionen mit dem t-Test für verbundene Stichproben. Signifikanz wie folgt gekennzeichnet: *p < 0,05.

Tabelle 27. Prozentuale Darstellung der FLG mRNA Regulation unter Psoriasis- und AD-Kondition. 100% entspricht jeweils dem Expressionslevel der nicht mit Zytokin stimulierten Keratinozyten der Kontrollzellen bzw. unter GATA-3 knock down.

Spender FLG	Psoriasis-Kondition Control shRNA	Psoriasis-Kondition GATA-3 shRNA	AD-Kondition Control shRNA	AD-Kondition GATA-3 shRNA
17/09	1%	0%	146%	52%
11/05	5%	0%	345%	113%
104/04	1%	1%	53%	100%
25/07	0%	0%	56%	27%
02/07	1%	0%	42%	55%
Lonza	0%	27%	4%	0%
Lonza Neo 22259	0%	0%	49%	28%
Median	1%	0%	53%	52%
Mittelwert	1%	4%	99%	53%

4.4.1.2 Loricrin mRNA Gehalte in Kontroll- und GATA-3 gesilenceten Zellen unter entzündlichen Bedingungen

LOR ist als Strukturprotein des CE zentraler Bestandteil des *epidermal differentiation complex gene cluster* mit elementarer Bedeutung in späten Stadien des terminalen Differenzierungsprozesses der Keratinozyten. **Abbildung 24** demonstriert die Regulation von LOR in Kontroll- sowie GATA-3 gesilenceten Keratinozyten unter inflammatorischen Konditionen.

Die Kontrollzellen zeigten unter Psoriasis-ähnlichen Konditionen im Vergleich zu basalen Bedingungen eine Herunterregulation des LOR Levels an die Nachweisgrenze (0% Expression). Die AD-Konditionen führten ebenfalls zu einer Reduktion des basalen LOR Levels (Median 53%).

In den Keratinozyten mit modulierter GATA-3 Expression zeigte sich die LOR Expression unter Psoriasis-ähnlichen Konditionen ebenfalls bis an die Nachweisgrenze herunterreguliert. Auch durch Stimulation mit AD-ähnlichen Konditionen zeigte sich eine Reduktion, hier zeigte sich das basale LOR Level im Vergleich zu den basalen Konditionen etwa 5-fach herunterreguliert (Median 19%).

Durch die Behandlung mit GATA-3 shRNA ließ sich unter basalen Konditionen zwischen Kontrollzellen und GATA-3 gesilenceten Zellen keine relevante Differenz demonstrieren ($p=0,1953$).

Unter Psoriasis-ähnlichen Konditionen konnte zwischen Kontrollzellen und GATA-3 gesilenceten Keratinozyten bei Herunterregulation an die Nachweisgrenze kein relevanter Unterschied in der Expression festgestellt werden.

Die Stimulation mit AD-ähnlichen Konditionen zeigte tendenziell bei modulierter GATA-3 shRNA Expression eine stärker herunterregulierte LOR Expression als in den Kontrollzellen (Median 19% vs. 53%, $p=0,0986$). Bei 4 von 8 Spendern zeigte sich die LOR mRNA in den GATA-3 gesilenceten Keratinozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen herunterreguliert, bei 3 Spendern auf vergleichbarem Level mit den Kontrollzellen.

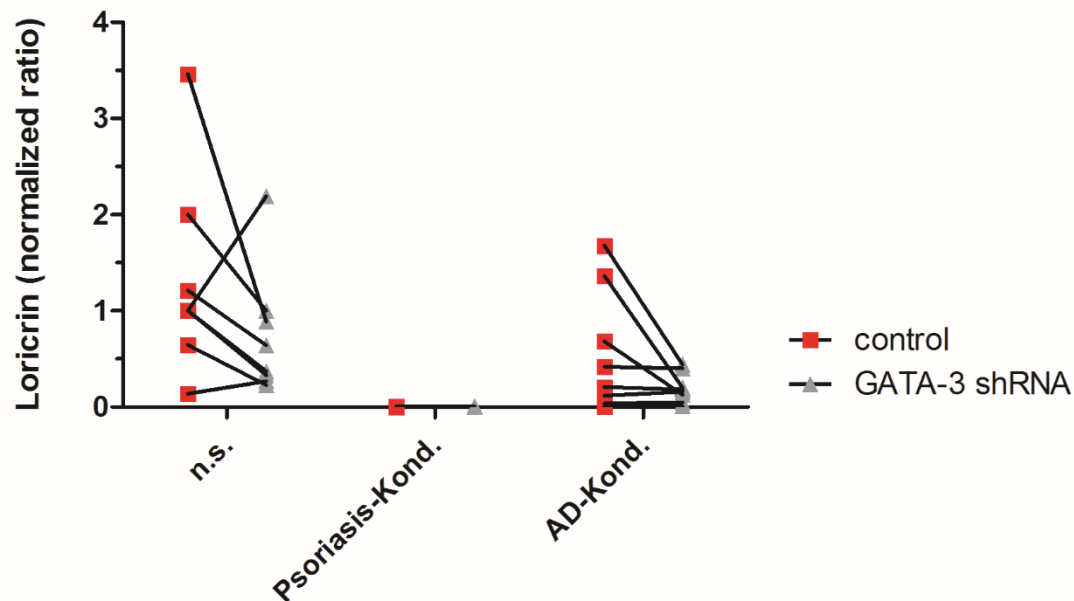


Abbildung 24. Verminderte LOR mRNA Gehalte in GATA3 gesilenceten Keratinozyten unter unterschiedlichen inflammatorischen Konditionen. Gezeigt werden qRT-PCR Daten von unstimulierten und stimulierten Keratinozyten, die entweder mit GATA3 shRNA oder einer nonsense shRNA (control) behandelt wurden. Psoriasis-ähnliche Konditionen: TNF α (10 ng/ml), IL-22 (10 ng/ml), OSM (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml). AD-ähnliche Konditionen: IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml). Stimuliert wurde für je 72h zum Zeitpunkt einer Konfluenz von etwa 75%. N = 8. Normalisiert auf PGK-1. Der Test auf Signifikanz für die AD-ähnlichen Konditionen wurde mit dem t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt, für die basalen Bedingungen und die Psoriasis-ähnlichen Konditionen mit dem Wilcoxon-Test für verbundenen Stichproben.

Tabelle 28. Prozentuale Darstellung der LOR mRNA Regulation unter Psoriasis- und AD-Kondition. 100% entspricht jeweils dem Expressionslevel der nicht mit Zytokin stimulierten Keratinozyten der Kontrollzellen bzw. unter GATA-3 knock down.

Spender LOR	Psoriasis-Kondition Control shRNA	Psoriasis-Kondition GATA-3 shRNA	AD-Kondition Control shRNA	AD-Kondition GATA-3 shRNA
17/09	0%	0%	56%	20%
11/05	0%	4%	211%	88%
104/04	0%	0%	49%	50%
60/03	0%	0%	28%	18%
25/07	0%	0%	12%	43%
02/07	0%	0%	11%	18%
Lonza Neo 22259	0%	0%	1%	3%
Lonza	0%	0%	42%	18%
Median	0%	0%	53%	19%
Mittelwert	0%	1%	51%	32%

4.4.1.3 Involucrin mRNA in Kontroll- und GATA-3 gesilenceten Zellen unter entzündlichen Bedingungen

IVL wird als früher Differenzierungsmarker der Gruppe der *precursor proteins* des *epidermal differentiation complex gene clusters* zugeordnet [254].

Wie in **Abbildung 25** und **Tabelle 29** gezeigt, führten die Psoriasis-ähnlichen Bedingungen im Vergleich zu basalen Bedingungen in den Kontrollzellen bei allen 8 Spendern zu einer Herunterregulation der IVL mRNA (Median 6%). Auch unter AD-ähnlichen Konditionen ließ sich eine Herunterregulation der Expressionslevel verglichen mit basalen Konditionen demonstrieren, diese fiel jedoch weniger stark aus als unter Psoriasis- ähnlichen Konditionen (Median 63%). Eine Herunterregulation zeigten hier insgesamt 7 von 8 Spendern.

Die GATA-3 gesilenceten Keratinozyten zeigten unter Psoriasis-ähnlichen Konditionen ebenfalls eine starke Herunterregulation des IVL-Expressionslevels (Median 7% verglichen mit basalen Konditionen). Die Repression der IVL Expression ließ sich auch hier in allen 8 Spendern demonstrieren. Unter AD-Bedingungen zeigte sich kein eindeutiger Effekt auf die IVL Expression; 4 von 8 Spendern zeigten eine Induktion der IVL Expression verglichen mit basalen Bedingungen, die anderen 4 Spender eine Repression der IVL Expression (Median 92%, Mittelwert 141%).

Der Vergleich von Kontrollzellen mit Keratinozyten mit modulierter GATA-3 Expression zeigte unter basalen Bedingungen keinen relevanten Unterschied des IVL Expressionslevels ($p=0,8274$).

Unter Psoriasis-Bedingungen wiesen sowohl Kontroll- als auch GATA-3 gesilencete Zellen eine starke Repression der IVL mRNA auf; ein statistischer Zusammenhang war in diesem Kontext nicht nachweisbar ($p=0,6383$).

Die Stimulation mit AD-ähnlichen Konditionen zeigte bei modulierter GATA-3 Expression tendenziell eine Induktion der IVL-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen ($p=0,0508$). Eine Heraufregulation ließ sich bei 4 von 8 Spendern demonstrieren, 2 Spender zeigten ein nahezu unverändertes IVL Expressionslevel.

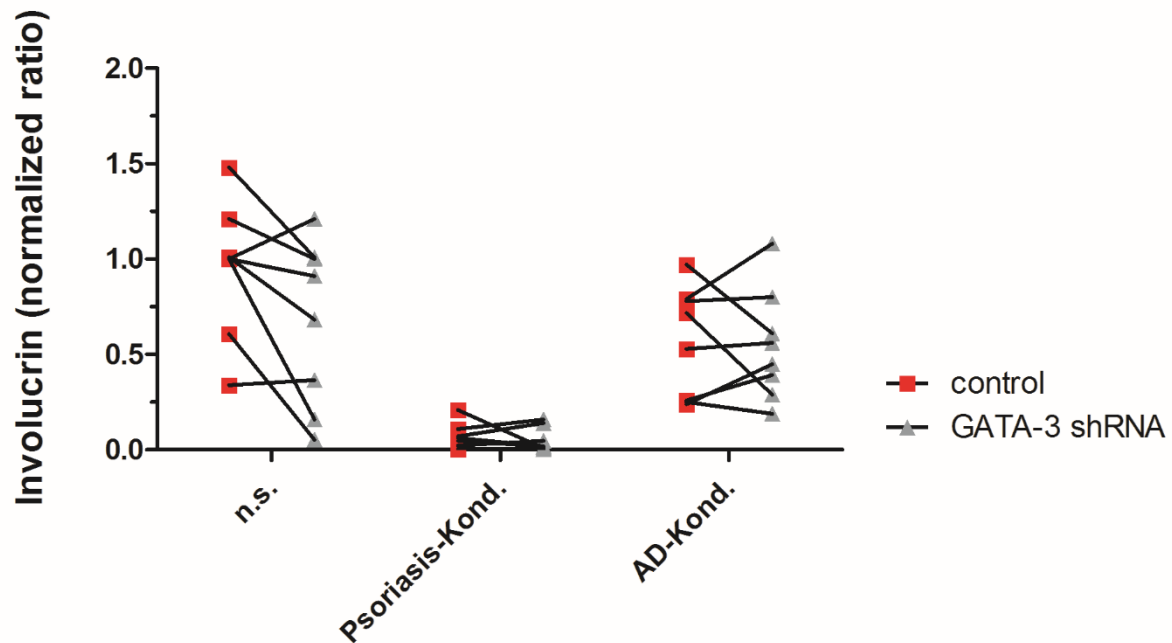


Abbildung 25. IVL mRNA Gehalte in GATA3 gesilenceten Keratinozyten unter unterschiedlichen inflammatorischen Konditionen. Gezeigt werden qRT-PCR Daten von unstimulierten und stimulierten Keratinozyten, die entweder mit GATA3 shRNA oder einer nonsense shRNA (control) behandelt wurden. Psoriasis-ähnliche Konditionen: $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml), IL-22 (10 ng/ml), OSM (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml). AD-ähnliche Konditionen: IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml). Stimuliert wurde für je 72h zum Zeitpunkt einer Konfluenz von etwa 75%. N = 8. qRT-PCR, normalisiert auf PGK-1. Für alle Konditionen wurde der t-Test für verbundene Stichproben angewandt.

Tabelle 29. Prozentuale Darstellung der IVL mRNA Regulation unter Psoriasis- und AD-Kondition. 100% entspricht jeweils dem Expressionslevel der nicht mit Zytokin stimulierten Keratinozyten der Kontrollzellen bzw. unter GATA-3 knock down.

Spender IVL	Psoriasis-Kondition Control shRNA	Psoriasis-Kondition GATA-3 shRNA	AD-Kondition Control shRNA	AD-Kondition GATA-3 shRNA
17/09	5%	3%	26%	57%
11/05	6%	13%	156%	153%
104/04	4%	2%	48%	29%
60/03	1%	7%	41%	358%
25/07	7%	15%	79%	119%
02/07	9%	16%	80%	61%
Lonza Neo 22259	21%	6%	24%	281%
Lonza	0%	1%	78%	66%
Median	6%	7%	63%	92%
Mittelwert	7%	8%	67%	141%

4.4.1.4 Einfluss von GATA-3 auf die Expression von Kallikrein-1 mRNA

Für GATA-3 ist eine direkte positive Regulation der Kallikrein-1-Expression (KLK1-Expression) beschrieben [255]. Um dies zu überprüfen führten wir eine qRT-PCR zur Detektion der KLK1 Expression in den GATA-3 shRNA und control shRNA transduzierten Keratinozyten durch.

Die Ergebnisse werden in **Abbildung 26** demonstriert. In diesem experimentellen Setting zeigt sich, dass die Differenzierung der Keratinozyten (verbunden mit der GATA-3 Induktion) durch Calcium-Stimulation zu einer gesteigerten KLK1-Expression in allen Keratinozyten, unabhängig von der Behandlung mit shRNA, führt. Bei allen 4 Kontrollzellen zeigte sich unter Calcium-Stimulation ein höheres KLK1-Expressionslevel, wobei das basale Level (sowohl mit als auch ohne Calcium-Stimulation) bei einem Spender deutlich unter dem der anderen lag. Visuell ließ sich die KLK1-Induktion bei den Kontrollzellen in 3 von 4 Spendern demonstrieren.

Die Keratinozyten mit modulierter GATA-3 Expression zeigten ohne Calcium-Stimulation bei 3 von 4 Spendern ein niedrigeres KLK1-Expressionslevel verglichen mit den Kontrollzellen. In den mit GATA-3 shRNA transduzierten Zellen zeigte sich mit Ausnahme eines Spenders tendenziell eine geringere Induktion der KLK1-Expression.

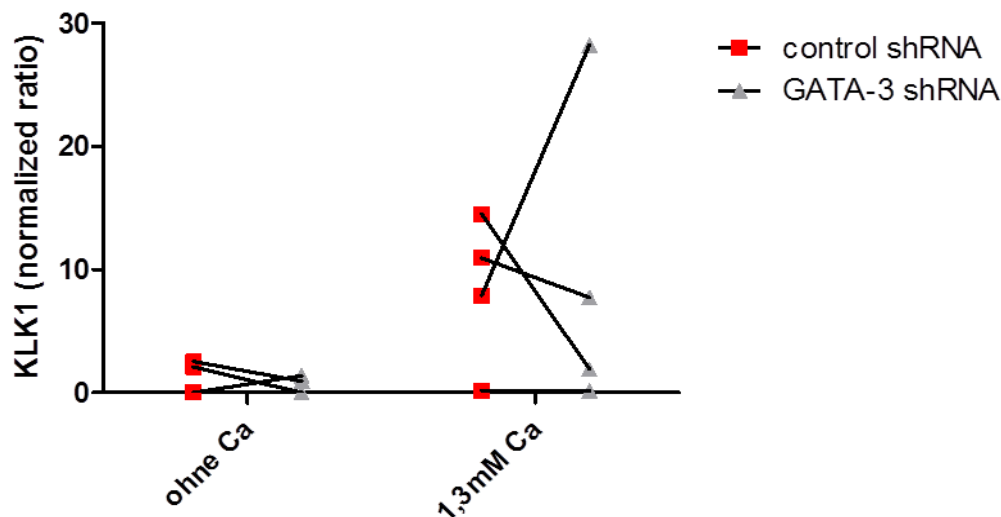


Abbildung 26. KLK1-mRNA Gehalte in in GATA3 gesilenceten Keratinozyten und Kontrollzellen unter basalen Bedingungen und nach Ca^{2+} -Stimulation. Dargestellt sind qRT-PCR Daten. Die Ca^{2+} -Stimulation erfolgte mit 1,3mM Ca^{2+} für 72h. Normalisiert auf PGK-1. N = 4.

4.5 Immunhistochemische Färbungen

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden auf Protein-Ebene durch immunhistochemische Färbungen, wie in **Kapitel 2.9**, beschrieben, überprüft.

4.5.1 Immunhistochemische Färbung von GATA-3 am Hautschnitt

In der immunhistochemischen Färbung am Hautschnitt war das Protein GATA-3 in den Nuklei der suprabasalen Keratinozyten der Epidermis darstellbar (**Abbildung 27**). Die Färbung der Zellkerne scheint in oberen Schichten intensiver.

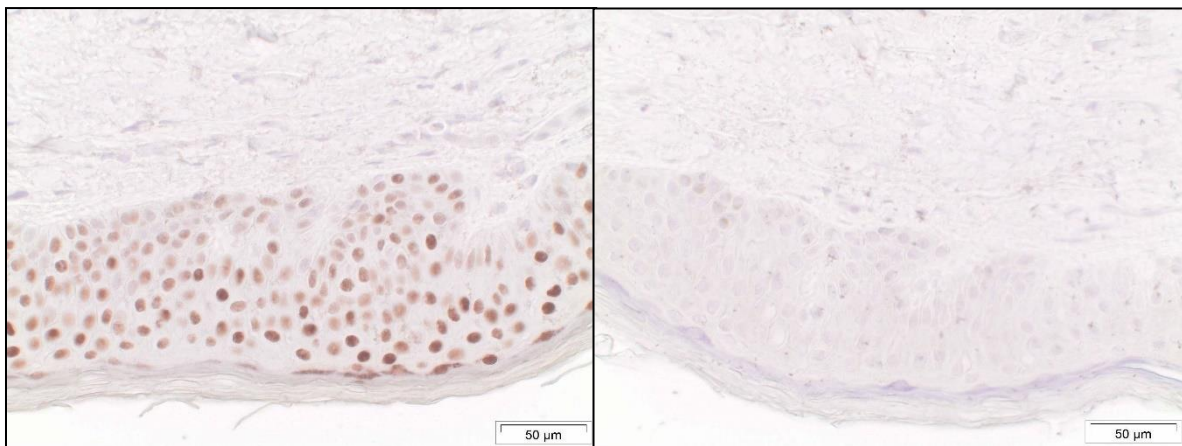


Abbildung 27. Immunhistologie: Detektion von GATA3 in der Epidermis gesunder Spender.

Links: Immunhistochemische Färbung für GATA-3 am Hautschnitt. Rechts: Isotyp-Kontrolle.

4.5.2 Immunhistochemische Färbung von GATA-3 am 3D-Hautmodell

In dieser Versuchsreihe wurden 3D Hautmodelle aus Keratinozyten generiert, die zuvor lentiviral mit der GATA3 shRNA oder der control shRNA transduziert wurden. Die Behandlung mit GATA-3 shRNA führt zu einer reduzierten Expression von GATA-3 auf Proteinebene. Im Vergleich zu den mit control shRNA (**Abb. 28 a-c**) behandelten Zellen, deutete die Färbung in den für GATA-3 gesilenceten Zellen (**Abb. 28 d-f**) auf eine geringere Expression des Transkriptionsfaktors hin. Vollständig war die GATA-3 Proteinsynthese jedoch bei Behandlung mit GATA-3 shRNA nicht unterdrückt (**Abb. 28d**). In den Kontrollzellen war GATA-3 unter AD-ähnlichen Konditionen unverändert, während es unter Psoriasis ähnlichen Konditionen zu einer Reduktion der Proteingehalte kam (vgl. **Abb. 28b** und **c**). Im Vergleich zu den Kontrollzellen blieb die Induktion von GATA-3 durch AD-ähnliche Bedingungen in den für GATA-3 gesilenceten Zellen aus. Die Stimulation mit Psoriasis-ähnlichen Zytokinen führt sowohl für die Zellen mit Behandlung durch control shRNA als auch GATA-3 shRNA zu einer reduzierten Nachweisbarkeit von GATA-3.

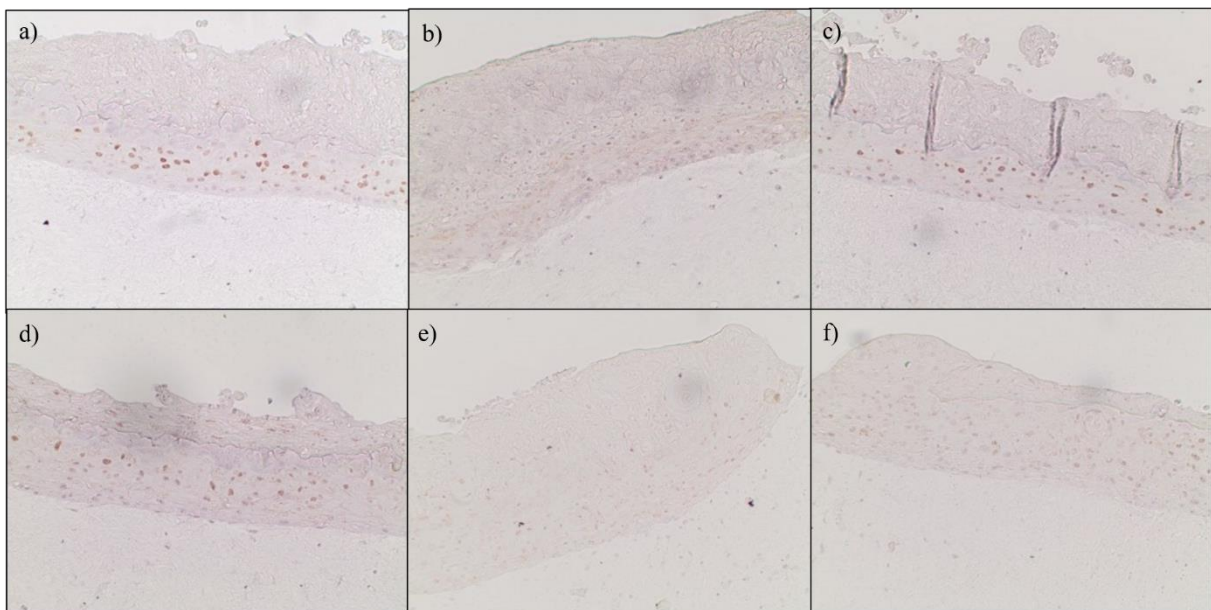


Abbildung 28. Immunhistochemische Färbung von GATA-3 eines exemplarisch ausgewählten Hautmodells, aufgenommen mit 10-facher Vergrößerung. a) control shRNA, n.s., b) control shRNA, Psoriasis-ähnliche Konditionen. c) control shRNA, AD-ähnliche Konditionen. d) GATA-3 shRNA, n.s., e) GATA-3 shRNA, Psoriasis-ähnliche Konditionen. f) GATA-3 shRNA, AD-ähnliche Konditionen. Psoriasis-ähnliche Konditionen: TNF α (10 ng/ml), IL-22 (10 ng/ml), OSM (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml). AD-ähnliche Konditionen: IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml). Exemplarische Abbildung von N=5.

4.5.3 Immunfluoreszenz-Färbung von Filaggrin am 3D-Hautmodell

Abbildung 29 zeigt eine exemplarisch ausgewählte Immunfluoreszenz-Färbung von FLG am 3D-Hautmodell.

Die Behandlung mit GATA-3 shRNA führte tendenziell zu einem reduzierten FLG-Gehalt im Vergleich zur control shRNA. Der Einfluss von AD- bzw. Psoriasis-ähnlichen Konditionen hatte in der Tendenz auf nicht gesilencete und GATA-3 gesilencete Zellen einen unterschiedlichen Effekt. In den für GATA-3 gesilenceten Zellen zeigte sich der FLG-Gehalt unter AD-ähnlichen Bedingungen tendenziell erhöht. Im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen zeigte sich bei den GATA-3 gesilenceten Zellen auch unter den Psoriasis-ähnlichen Bedingungen tendenziell eine erhöhte FLG-Expression.

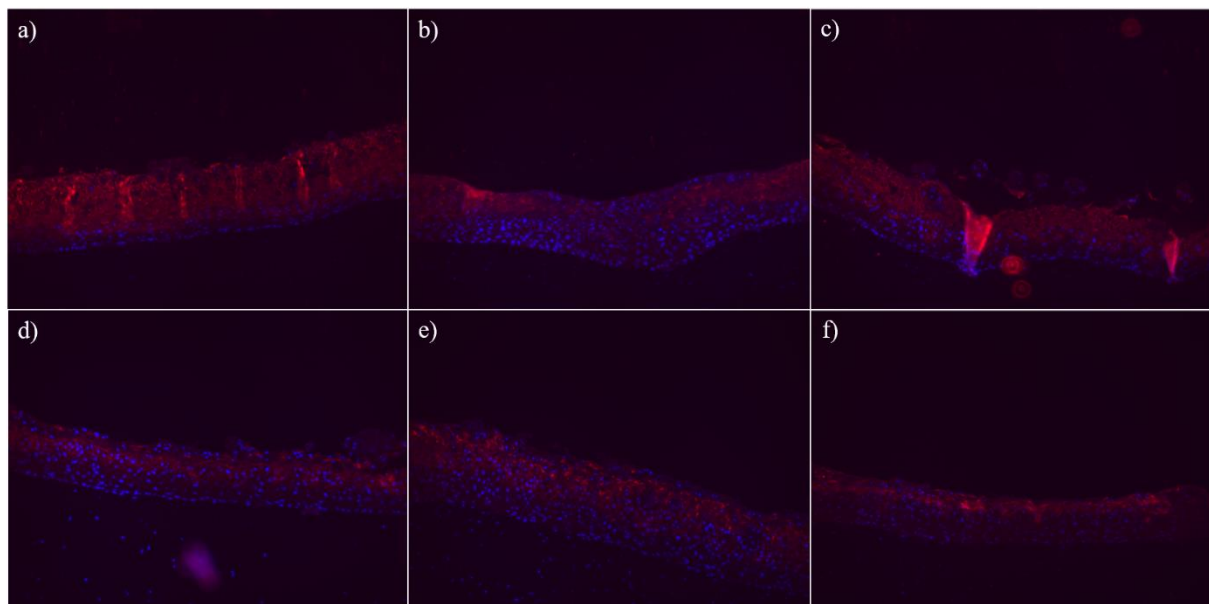


Abbildung 29. Modulation der FLG Proteingehalte in 3D-Hautmodellen mit GATA3 *knock down* unter entzündlichen Konditionen. Immunfluoreszenz-Färbung für FLG (in rot dargestellt) eines exemplarisch ausgewählten Hautmodells (n=4), aufgenommen mit 4-facher Vergrößerung, DAPI (Kontroll-Kernfärbung): blau. a) control shRNA, n.s., b) control shRNA, Psoriasis-ähnliche Konditionen. c) control shRNA AD-ähnliche Konditionen. d) GATA-3 shRNA, n.s., e) GATA-3 shRNA, Psoriasis-ähnliche Konditionen. f) GATA-3 shRNA, AD-ähnliche Konditionen. Psoriasis-ähnliche Konditionen: TNF α (10 ng/ml), IL-22 (10 ng/ml), OSM (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml). AD-ähnliche Konditionen: IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml). Exemplarische Abbildung von N=2.

4.6 Auswertung der Ergebnisse aus Western Blot-Experimenten

Zur weiteren Beurteilung des Effekts der lentiviralen Transduktion mittels GATA-3 shRNA auf Protein-Ebene wurden Western Blot-Experimente durchgeführt. Hier wurden primär die Proteingehalte von prozessiertem FLG demonstriert.

Der Zeitpunkt der Proteinextraktion für den Western Blot wurde dabei so gewählt, dass die prozessierte Form von FLG als Differenzierungsmarker darstellbar war. In früheren Phasen der Zelldifferenzierung liegt vornehmlich die Vorläuferform, das Pro-FLG, vor. Die Konditionen wurden entsprechend angepasst, um FLG nachweisen zu können. Dies machte die Kultur von superkonfluenten Keratinozyten erforderlich. Nach 120-stündiger Konfluenz wurden die Zellen anhand des beschriebenen Stimulationsschemas für weitere 72 Stunden behandelt (siehe **Kapitel 2.7** und **4.3.2**). Da die Keratinozyten über diesen langen Zeitraum ausdifferenzieren, sind andere, frühere Differenzierungsmarker kaum noch nachweisbar, siehe **Abbildung 31**.

4.6.1 Etablierung des Western Blot für Filaggrin - Titration des Antikörpers

Die Konzentration, in der der FLG-Ak zum Einsatz kamen, wurde austitriert. Es zeigten sich sowohl für die Konzentration von 1:100 als auch für 1:250 deutliche Banden in der qualitativen Auswertung. Quantitativ ergaben sich annähernd gleiche Werte für den FLG-Gehalt der Probe. Im Folgenden wurde entsprechend der FLG-Ak 1:250 mit TBST (*tris-buffered saline with tween* + BSA 5%) verdünnt.

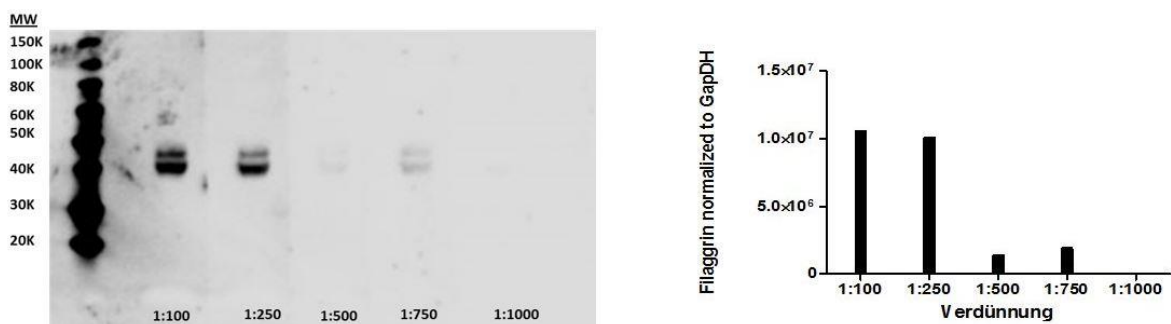


Abbildung 30. Titration des FLG-Ak für den WB. Links: Western Blot der FLG-Ak-Titration. Rechts: Semi-quantitative Auswertung mittels Densitometrie. Normalisiert auf GAPDH.

4.6.2 Expression von Filaggrin in Kontroll- und GATA-3 gesilenceten Zellen unter entzündlichen Bedingungen – Veränderungen auf Proteinebene

Zur Evaluation der FLG-Expression wurden zytoplasmatische Extrakte von Keratinozyten, die zuvor mit control shRNA oder GATA-3 shRNA behandelt worden waren, mittels Western Blot untersucht.

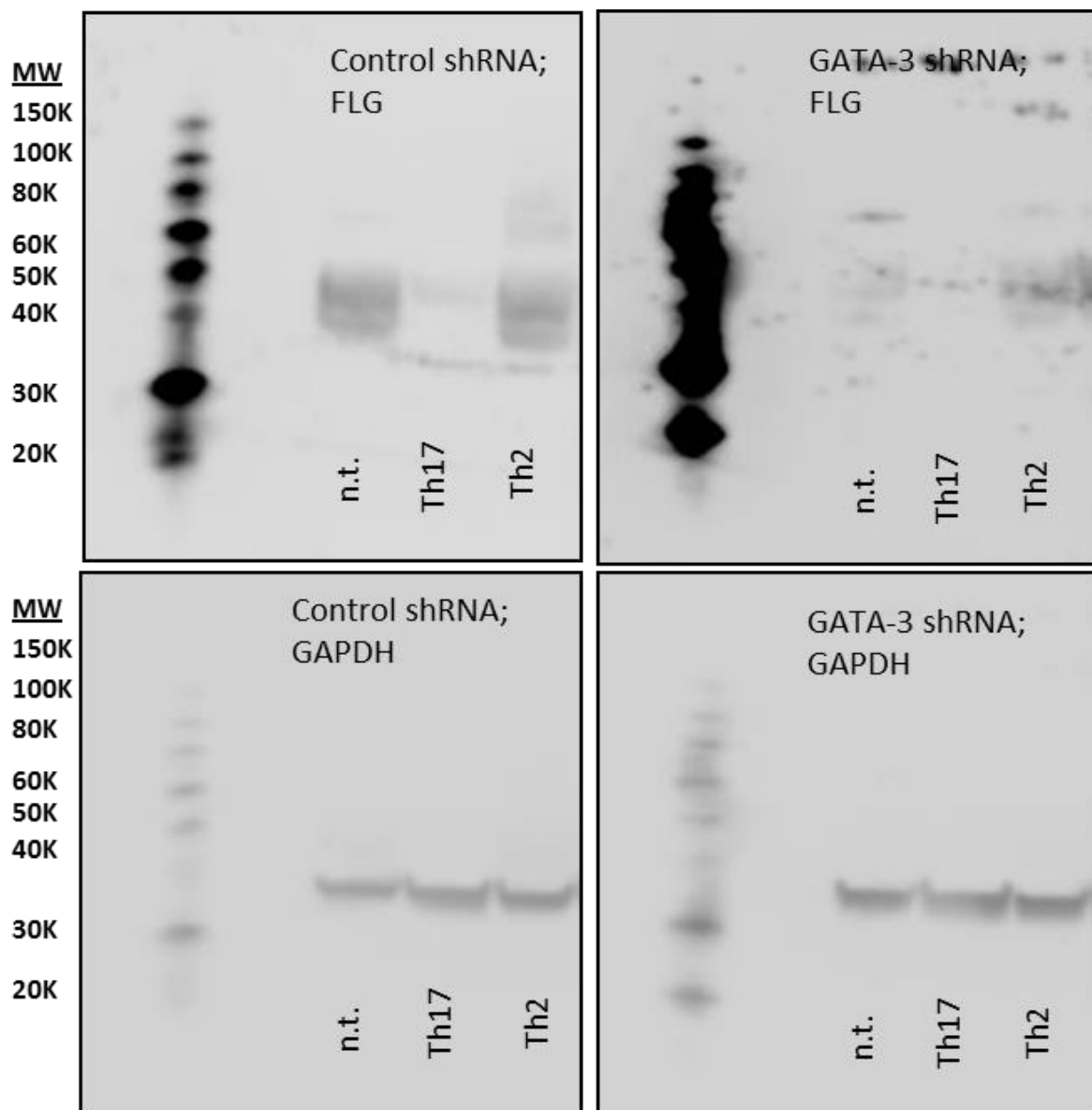


Abbildung 31. Exemplarische Darstellung des FLG-Western Blot in inverser Farbgebung. In der oberen Reihe sind die Färbungen mit dem FLG-Ak dargestellt. Die untere Reihe zeigt die Detektion des Referenzgens GAPDH. Die Daten stammen von GATA3 gesilenceten Keratinozyten (GATA3 shRNA) bzw. entsprechenden Kontrollen (control) im Stadium. Psoriasis-ähnliche Konditionen: $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml), IL-22 (10 ng/ml), OSM (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml). AD-ähnliche Konditionen: IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml). N=3.

Abbildung 32 zeigte die reduzierte FLG Expression auf Proteinebene unter modulierter GATA-3 Expression.

Die Kontrollzellen zeigten unter Psoriasis-ähnlichen Bedingungen ein niedrigeres Filaggrin-Level verglichen mit den nicht stimulierten Kontrollzellen. Auch unter AD-ähnlichen Konditionen zeigte sich das Expressionslevel im Vergleich zu den nicht stimulierten Keratinozyten reduziert, allerdings nicht so stark wie unter den Psoriasis-ähnlichen Bedingungen.

Die GATA-3 gesilenceten Zellen zeigten unter Psoriasis-ähnlichen Konditionen ebenfalls ein deutlich reduziertes FLG-Level. Auch unter AD-ähnlichen Konditionen war die Expression von FLG verglichen mit basalen Bedingungen herunterreguliert.

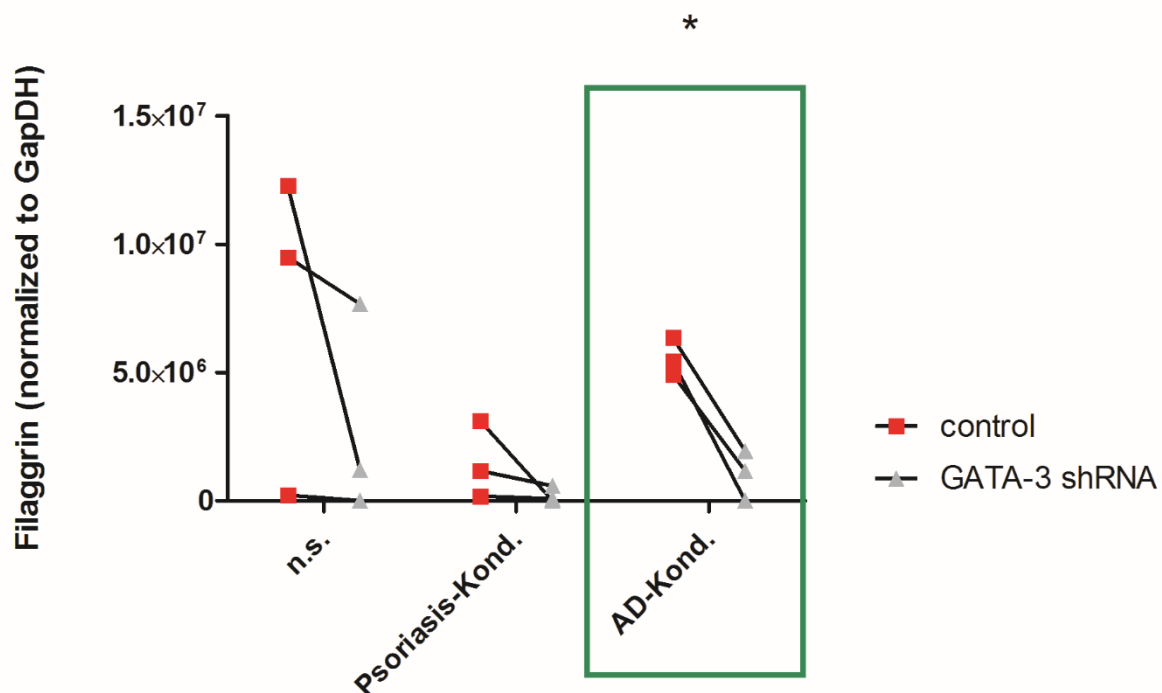


Abbildung 32. GATA3 gesilencete primäre humane Keratinozyten zeigen unter AD-ähnlichen Konditionen signifikant verminderte FLG Proteingehalte. Densiometrische Auswertung der FLG Western Blots mit Normalisation auf das HKG GapDH. Die Daten stammen von GATA3 gesilenceten Keratinozyten (GATA3 shRNA) bzw. entsprechenden Kontrollen (control shRNA) im Stadium der Superkonfluenz. Psoriasis-ähnliche Konditionen: TNF α (10 ng/ml), IL-22 (10 ng/ml), OSM (25 ng/ml), IL-17 (25 ng/ml). AD-ähnliche Konditionen: IL-4 (25 ng/ml), IL-13 (25 ng/ml). N = 3. Densiometrische Auswertung mittels Software *ImageJ*. Der Test auf statistische Signifikanz erfolgte durch den t-Test für verbundene Stichproben. Signifikanz wie folgt gekennzeichnet: *p < 0,05. Auf Grund der geringen Fallzahl konnte auf Normalverteilung nur mittels Shapiro-Wilk-Test getestet werden, der eine Normalverteilung für alle Konditionen ergab.

Im Vergleich von GATA-3 gesilenceten Keratinozyten mit Kontrollzellen zeigten alle 3 Spender eine Tendenz zur Herunterregulation des FLG-Levels. Dieser Unterschied in der Expression war jedoch nicht signifikant (p=0,3256).

Auch unter den Psoriasis-ähnlichen Konditionen zeigten die GATA-3 gesilencierten Keratinozyten tendenziell eine stärkere Herunterregulation der FLG Expression als die Kontrollzellen ($p=0,3063$); insgesamt zeigten jedoch beide Zellen hier eine deutliche Reduktion des FLG Expressionslevels.

Unter AD-Konditionen konnte eine signifikante Herunterregulation von FLG in den GATA-3 gesilencierten Keratinozyten verglichen mit Kontrollzellen demonstriert werden ($p=0,0113$).

5 Diskussion

Die Betrachtung des Transkriptionsfaktors GATA-3 ist von besonderem Interesse, da GATA-3 in der Epidermis sowohl in Immunzellen als auch in Keratinozyten nachgewiesen werden kann. GATA-3 wird als potentielle Zielstruktur bei Th2-dominierten Erkrankungen diskutiert [256–258]. Hierzu zählen die Erkrankungen des atopischen Formenkreises wie atopische Dermatitis und allergisches Asthma. Für letztere Erkrankung wurde bereits erfolgreich gezeigt, dass GATA-3 ein vielversprechendes *target* in der Therapie darstellt [259]. Inwieweit der Transkriptionsfaktor als Zielstruktur therapeutischer Optionen in Hinblick auf Hauterkrankungen geeignet ist, die zunehmend unter dem Aspekt der gestörten epidermalen Barriere betrachtet werden, wird diskutiert [60, 260].

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der zentralen Rolle, die der Transkriptionsfaktor in der Entstehung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere einnimmt [1, 60, 61]. Konkret wurden die Effekte einer modulierten GATA-3 Expression in der Epidermis untersucht. Die Untersuchungen wurden unter inflammatorischen Bedingungen durchgeführt, die zum einen eine mit der Psoriasis-assoziierte Entzündungssituation simulieren sollten, zum anderen eine Th2-dominierte AD-ähnliche Entzündung abbilden sollte.

5.1 Diskussion der gewählten Methodik

Die erfolgreiche lentivirale Transduktion primärer humaner Keratinozyten mittels GATA-3 shRNA war Grundvoraussetzung der folgenden Analysen. Der Erfolg des GATA-3 Silencing wurde mittels MA und qRT-PCR auf mRNA-Ebene sowie via immunhistochemischer Färbung auf Protein-Ebene validiert.

Kritisch angemerkt werden muss, dass sich die Zellkultur der Keratinozyten als schwierig gestaltete. Es gelang oftmals nicht, sowohl control shRNA als auch GATA-3 shRNA Zellen eines Spenders zu kultivieren. Idealerweise sollten nur Zellen identischer Passagen in die Auswertung eingehen. Komplikationen entstanden vermehrt durch den einsetzenden Wachstumsarrest einer der Zellarten. Die für GATA-3 gesilenceten Zellen zeigten zudem eine höhere Proliferationskapazität im Vergleich zu den Kontrollzellen, so dass die Analyse von Zellen mit identischer Passagenanzahl erschwert war. Dementsprechend ist die Anzahl der Datensätze reduziert, die in die endgültige Auswertung eingingen im Vergleich zu den tatsächlich durchgeführten Versuchsansätzen. In Bezug auf die (statistische) Auswertung zeichnen sich bei der relativ geringen Fallzahl folglich häufiger eher Tendenzen ab, als dass statistische Signifikanzen ermittelt werden können.

Physiologisch ist das Wachsen primärer humaner Keratinozyten als mehrschichtiges Epithel. Die Zellkultur primärer humaner Keratinozyten ist zunächst ein Monolayer, so dass Aussagen durch das unphysiologische Wachstumsverhalten limitiert sind [261]. Um hierdurch bedingte aberrante Genexpressionen zu minimieren, wurde zur Validierung der Daten aus der Monokultur das 3D-Hautmodell mit control shRNA und GATA-3 shRNA transduzierten Keratinozyten etabliert. Dies ermöglichte die Betrachtung der Zielstrukturen mittels immunhistochemischer Färbung in einem mehrschichtigen Epithel. Kritisch anzumerken ist an dieser Stelle, dass sich den komplexen Mechanismen der Inflammation *in vivo* durch eine konstante Stimulation mit Zytokinkombinationen nur angenähert werden kann.

Die Verwendung des 3D-Hautmodells stellte einen möglichen Lösungsansatz für ein bekanntes Problem dar: Im Tiermodell ist die vollständige GATA-3^{-/-} Defizienz nicht mit dem Leben vereinbar [63, 66, 67]. Es existiert zwar ein spezielles Mausmodell, in dem GATA-3 nur in den Keratinozyten fehlt, jedoch ist die Betrachtung am Tiermodell zusätzlich durch abweichende Genexpression unter Zytokineinfluss limitiert. Zudem sollte hier die Betrachtung humaner epidermaler Zellen primäres Ziel sein. Nicht nur andere Spezies, auch immortalisierte humane Zellen können auf Grund aberranter Genexpression sowie eines veränderten Differenzierungsverhaltens unter Zytokineinfluss nur begrenzt als Modell für primäre humane Keratinozyten dienen [262].

Verkompliziert wurde die Analyse der Markerproteine durch die Expression in verschiedenen Stadien der Differenzierung der Keratinozyten. Keratinozyten beginnen in der Zellkultur in Abhängigkeit vom Stadium der Konfluenz auszudifferenzieren. Entsprechend der Differenzierungsphase unterscheiden sich die optimalen Analysezeitpunkte der frühen und

späten Differenzierungsmarker. Der Nachweis von Strukturproteinen wurde hier für FLG optimiert, da für dieses Molekül signifikante Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen vorlagen.

5.2 GATA-3: Bedeutung in der Differenzierung der Keratinozyten – Etablierung der epidermalen Barriere

GATA-3 wird eine Rolle in der Homöostase von Proliferation, Differenzierung und Migration der epidermalen Keratinozyten zugesprochen [1, 61]. Es konnte jedoch noch nicht vollständig aufgedeckt werden, welche Bedeutung GATA-3 hier zukommt [58, 59]. Zunächst soll die physiologische Rolle des Transkriptionsfaktors näher betrachtet werden. Dazu zählt das Expressionsmuster von GATA-3 in der humanen Epidermis unter basalen Bedingungen eines sich kontinuierlich erneuernden Organs. Unter diesem Aspekt ist die Expression des Transkriptionsfaktors in humanen Keratinozyten von verschiedenen Autoren primär in den suprabasalen Schichten der Epidermis beschrieben. Ebenso ist eine Abhängigkeit der GATA-3 Lokalisation innerhalb der Keratinozyten vom Zellzyklus (intranukleär oder zytoplasmatisch) beschrieben [1, 59]. Diese Beobachtung konnte auch in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten demonstriert werden. Im Hautschnitt fand sich der stärkste Nachweis von GATA-3 mittels immunhistochemischer Färbungen in den suprabasalen Schichten. Im 3D-Hautmodell wurde GATA-3 ebenfalls in den suprabasalen Schichten exprimiert. Zu betrachten sind hier lediglich die Hautmodelle, in denen nicht-stimulierte control shRNA transduzierte Keratinozyten verwendet wurden. Das Expressionsmuster von GATA-3 im 3D-Hautmodell war dem in biopsierter humaner Haut relativ ähnlich, so dass die Eignung des Modells anzunehmen ist. In den immunhistochemischen Färbungen erfolgte der Nachweis von GATA-3 ausschließlich im Nukleus. Anders als durch andere Arbeitsgruppen beschrieben, wurde GATA-3 in keinem Fall zytoplasmatisch nachgewiesen [59].

Zunehmend ist die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 Gegenstand wissenschaftlicher Forschung in Hinblick auf chronisch entzündliche Hautkrankheiten. Die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 in psoriatischer Haut untersuchte die Arbeitsgruppe um Racz et al. [59]. Sie beschrieb eine Herunterregulation der GATA-3 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in läsionaler Haut von Psoriasis-Patienten. Für die Th1-/Th17-assoziierten Zytokine TNF α , IFN- γ und IL-22 zeigte die Arbeitsgruppe um Racz et. al keine signifikanten Effekte auf die Expression von GATA-3 [59]. Das experimentelle Setting dieser Arbeit wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Racz et. al gewählt, die die Herunterregulation von GATA-3 in psoriasiformer Haut demonstrierten. Zudem gelang ihnen die Induktion von GATA-3 unter der Stimulation mit IL-4.

Dieser Versuchsansatz wurde in dieser Arbeit aufgegriffen. Durch Kombination der Zytokine und Ergänzung des Stimulationsschemas um OSM konnte in dieser Arbeit eine Herunterregulation der GATA-3 Expression unter Psoriasis-ähnlichen Bedingungen demonstriert werden: Die GATA-3 Expression war unter Psoriasis-ähnlichen Bedingungen auf mRNA- und Proteinebene reduziert.

Die Induktion der GATA-3 Expression untersuchten Racz et al. in Hautbiospien gesunder Donatoren. Dort wiesen sie eine Heraufregulation der GATA-3 Expression unter Einfluss des Schlüsselzytokins der Th2-vermittelten Immunreaktion IL-4 nach [59]. Die Heraufregulation der GATA-3 Expression wurde für diese Arbeit ebenfalls unter AD-ähnlichen Konditionen (Stimulation mit IL-4 und IL-13) auf mRNA-Ebene beobachtet. Im Unterschied zu Racz et al. wurden Untersuchungen in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene anhand von Zellkulturen gemacht. Es wurden Zytokinkombinationen getestet, um sich Psoriasis- und AD-ähnlichen Bedingungen zu nähern. Der Fokus dieser Arbeit liegt zudem nicht nur auf der Expression von GATA-3 unter verschiedenen Konditionen, sondern der Folge der GATA-3 Defizienz in Bezug auf die Expression von Strukturproteinen.

5.2.1 Dysregulation der Differenzierung

Die Defizienz von GATA-3 führt zu einer Imbalance von Proliferation und Differenzierung der epidermalen Zellen. In der Literatur ist bei Inhibition des Transkriptionsfaktors histologisch ein hyperkeratotisches Erscheinungsbild der epidermalen Zellen beschrieben [62]. Bedeutsam ist die Beobachtung, dass es bei GATA-3 Mangel zur verspäteten Expression wichtiger Markerproteine aller Differenzierungsstadien kommt. In dieser Arbeit konnten signifikante Effekte durch die lentivirale Transduktion mit GATA-3 shRNA erstmals für die Regulation der FLG-Expression demonstriert werden. Dies ist besonders interessant, da die FLG-Expression bislang unter GATA-3 Defizienz noch nicht näher betrachtet wurde. FLG zählt jedoch als wichtiges Strukturprotein ebenfalls zu den Proteinen, die im *late cornified envelope gene cluster* kodiert sind. Diese Arbeit weist nun auf eine positive Regulation der Expression von FLG durch GATA-3 hin. Zudem zeigte sich für die Genexpression von LOR und IVL als wichtige Strukturproteine tendenziell ebenfalls eine (negative) Regulation unter GATA-3 Defizienz. Masse et al. wiesen unter vergleichbaren inflammatorischen Bedingungen ebenfalls reduzierte Level von Differenzierungsmarkern in humanen Keratinozyten nach. Sie untersuchten die Expression von K1, K10, IVL und LOR sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene [59, 62].

Die in dieser Arbeit verwendeten inflammatorischen Konditionen schaffen AD- bzw. Psoriasis-ähnliche Bedingungen. Die Betrachtung der dysregulierten Differenzierungsmarker verleiht GATA-3 unter inflammatorischen Konditionen besondere Bedeutung und weist auf komplexe Regulationsmechanismen der Genexpression in der Pathogenese der Erkrankungen hin.

5.2.1.1 Filaggrin

FLG ist in vielerlei Hinsicht von hoher Bedeutung für die epidermale Barriere. Insbesondere die Aggregation der Keratine K1 und K10 zu makrofibrillären Bündeln in den Korneozyten führt zur Etablierung einer rigiden Barriere gegen die Umwelt [114]. Zudem entstehen bei der Prozessierung des Vorläufermoleküls Pro-FLG zu FLG ebenfalls NMFs, die die Epidermis vor Dehydratation schützen [113, 121]. Weniger Erkenntnisse existieren über ein weiteres Produkt der Prozessierung. Es handelt sich dabei um das Calcium-bindende Filaggrin 2 (FLG 2), dem ebenfalls eine Funktion in der Etablierung der epidermalen Barriere zugesprochen wird [111]. Kommt es zu Abweichungen in der FLG-Expression mit Störung der epidermalen Barriere,

führt der Funktionsverlust zu Änderungen des pH-Milieus in der Oberhaut. In Folge sind zahlreiche Enzyme in ihrer Aktivität - und damit die entsprechenden katalysierten Prozesse - beeinträchtigt. Im Mittelpunkt stehen hier Enzyme der Protein- und Lipidbiosynthese. Folgen sind weitere Defizite in der physiologischen Barrierefunktion mit erhöhter Suszeptibilität des Individuums. Die gestörte Morphogenese des CE kann somit weitreichende Konsequenzen haben.

Die Untersuchungen dieser Arbeit weisen erstmals deutlich auf eine positive Regulation der Expression von FLG durch GATA-3 hin. Unterschieden werden muss zwischen zwei verschiedenen Ebenen, auf denen die Expression von FLG beeinflusst werden kann. Zum einen kann die Aktivität der Gene variiert werden, zum anderen können Änderungen im Ablauf der Prozessierung stattfinden, die Einfluss auf die Quantität der regelrechten Endprodukte nehmen. Auf welcher Ebene durch GATA-3 reguliert wird, soll im Folgenden diskutiert werden. Zudem soll betrachtet werden, welchen Einfluss entzündliche Konditionen auf die FLG-Expression ausüben.

Tendenziell war die Expression von FLG bei GATA-3 Defizienz unter basalen Bedingungen auf mRNA-Ebene leicht reduziert. Unter Th2-ähnlichen Konditionen war das Level der FLG-mRNA in GATA-3 gesilenceten Keratinozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert. Die verhältnismäßig stärkere Regulation lässt sich dadurch erklären, dass unter Inflammation verschiedene Regulationsmechanismen ineinandergreifen. Einerseits besitzt die Stimulation mit Th2-assoziierten Zytokinen einen negativ-regulatorischen Effekt auf die FLG-Expression [114]. Zudem übt die GATA-3 Defizienz zusätzlich einen inhibierenden Effekt auf die Expression von FLG aus. Ob GATA-3 die Expression von FLG direkt oder indirekt reguliert, ist zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilbar.

Bemerkenswert ist die in dieser Arbeit demonstrierte Dominanz der negativ regulatorischen Effekte auf FLG unter Th2-assoziiierter Zytokinstimulation in nicht gesilenceten Zellen. Die Inhibition der FLG-Expression unter Th2-assoziiierter Inflammation wurde durch Howell et al. erstmals beschrieben [114]. Dem gegenüber ist ein positiv-regulatorischer Effekt auf die GATA-3 Expression in Keratinozyten unter der Stimulation mit IL-4 durch Racz et. al beschrieben [59]. Unter der Annahme einer Induktion von GATA-3 durch IL-4 liegt die Schlussfolgerung nahe, dass unter Th2-assoziierten Konditionen und der damit verbundenen Induktion von GATA-3 ebenfalls die Expression von FLG heraufreguliert sein könnte. Die Versuche dieser Arbeit zeigten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene reduzierte FLG-Level unter Stimulation mit den Th2-assoziierten Zytokinen in den Kontrollzellen sowie in den GATA-3 gesilenceten Keratinozyten. Die Induktion von GATA-3 führt unter den beschriebenen inflammatorischen Bedingungen also nicht zwangsweise zu einer Induktion der FLG-Expression. Unter diesen Bedingungen überwog folglich der Effekt der Th2-Zytokinstimulation gegenüber einer potentiellen Genaktivierung durch den Transkriptionsfaktor GATA-3. Die Ergebnisse dieser Arbeit lieferten einen Beitrag zu weitergehenden Analysen von Zeitvogel et al., die die hohe Bedeutung von GATA-3 für die regelrechte Differenzierung von Keratinozyten aufzeigen. Beschrieben wird in der gemeinsamen Publikation, in die auch Ergebnisse dieser Arbeit einfließen, dass die

Überexpression von GATA-3 in primären humanen Keratinozyten unter Th2-assoziierten Bedingungen zu einer signifikant erhöhten Expression von FLG im Vergleich zu den Kontrollzellen führt [263]. Die Expression von FLG scheint folglich komplexen Regulationsmechanismen zu unterliegen, die durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren und Zytokin-Milieu bestimmt werden.

Im Kontext chronisch entzündlicher Hauterkrankungen ist für die Erkrankung an atopischer Dermatitis eine FLG-Defizienz charakteristisch. Unbeantwortet ist bisher die Frage, ob ätiologisch immunologische Mechanismen im Vordergrund stehen oder ob dem primären Barrieredefekt der Epidermis die höhere Bedeutung zukommt [157, 264, 265]. Der Mangel an FLG kann angeboren sein, ist dies jedoch nur bei weniger als einem Drittel der Erkrankten [155–157]. Da Mutationen jedoch nur bei einem relativ geringen Anteil der Betroffenen identifiziert werden können, scheint der im Krankheitsverlauf erworbene FLG-Defekt für die meisten Patienten relevant zu sein.

Obwohl eine Hochregulation der GATA-3 Expression im Str. basale und den tieferen Schichten des Str. spinosum bei AD-Hautläsionen beobachtet wurde, war die Expression in den oberen Schichten des Str. spinosum bzw. innerhalb des Str. granulosum weiterhin geringer als in gesunder Haut. Die reduzierte GATA-3 Expression in den oberen Schichten des Str. spinosum und innerhalb des Str. granulosum könnte weiter zu der Reduktion der FLG Expression in Hautläsionen bei AD-Patienten beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen eine Modulation der FLG-Expression durch den negativ-regulatorischen Einfluss der in akuten Läsionen dominierenden Interleukine IL-4 und IL-13 mit Th2-Assoziation sowie einen Einfluss der GATA-3 Expression auf das FLG-Level [114]. Es zeigte sich in den GATA-3 defizienten Zellen unter Th2-assoziiierter Stimulation eine signifikante Reduktion des FLG-Levels im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auch das GATA-3-Level war unter den beschriebenen Konditionen signifikant reduziert.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die starke negative Regulation von FLG bei Erkrankung an AD ist eine mangelnde Induzierbarkeit von GATA-3 unter IL-4 und eine damit einhergehende Herunterregulation der FLG-Expression. Unter der Annahme einer bestehenden GATA-3 Defizienz - und einer konsekutiv ausbleibenden oder verminderten GATA-3-Induktion in Keratinozyten unter Th2-assoziiierter Inflammation - käme es folglich zu einer nochmals verstärkten Reduktion des FLG-Levels bei Ausbleiben der FLG-Induktion durch GATA-3 [59]. Nicht zu vernachlässigen ist an dieser Stelle, dass die erhöhte GATA-3 Expression *in vivo* wiederum die Expression von Zytokinen, insbesondere von IL-4 in Th2-Zellen, induziert und Regulationsmechanismen weiter an Komplexität gewinnen. Da IL-4 GATA-3 induziert, besteht hier ein selbstverstärkender Prozess im Sinne einer Autoinduktion. Bei GATA-3 Defizienz der Keratinozyten könnte dieser Effekt ausbleiben. Unter diesem Aspekt lässt sich die Relevanz von GATA-3 bzw. der GATA-3-Defizienz in Keratinozyten als mögliche Ursache für reduzierte FLG-Level in chronisch-entzündlichen Hautkrankheiten diskutieren. Betrachtet man reduzierte FLG-Level in AD als Konsequenz mangelnder Induzierbarkeit bei GATA-3-Defizienz, ergibt sich mit GATA-3 ein neues *target* unter therapeutischen Aspekten. Durch

Induktion von GATA-3 könnte die Expression von FLG heraufgesetzt werden und dem FLG-Mangel so begegnet werden.

Psoriasis-ähnliche Bedingungen wurden etabliert, um sich der Pathophysiologie des psoriatischen Erkrankungsbildes anzunähern. Auf mRNA-Ebene findet auch unter Th1/Th17-assoziiierter Inflammation eine deutliche Reduktion der FLG-Expression statt. Sowohl in den Kontrollzellen als auch in den GATA-3 gesilenceten Keratinozyten ist die Expression hier deutlich vermindert, ein Unterschied ließ sich zwischen ihnen tendenziell kaum mehr erkennen. Die Reduktion des FLG-Levels unter Psoriasis-ähnlichen Bedingungen war bereits durch andere Arbeitsgruppen beschrieben, die sich auf die Stimulation mit IL-17, IL-22 und TNF α fokussieren [113, 114, 121, 122]. In den vorhergehenden Arbeiten wurden die Zytokine und ihr Effekt auf die Filaggrin Expression jedoch einzeln betrachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem kombinierten Ansatz gearbeitet, der neben IL-17, IL-22 und TNF α auch noch OSM enthielt. Der hiermit erzielte Effekt auf die Filaggrin Expression überstieg die zuvor gemachten Beobachtungen der einzelnen Zytokine um ein Vielfaches. Es ist von synergistischen Effekten der Zytokine auf Keratinozyten auszugehen.

Im Kontext der Erkrankung an Psoriasis könnten die in dieser Arbeit beobachteten Änderungen in der FLG-Expression das histologische Bild erklären: Als später Differenzierungsmarker würde FLG in den zumeist unreifen Zellen nicht mehr regelrecht exprimiert werden. Unter der Annahme, dass diese Entwicklung auf den Einfluss der Zytokine zurückzuführen ist, ergibt sich an dieser Stelle eine mögliche Erklärung für ein Ungleichgewicht zwischen proliferierenden und differenzierenden Keratinozyten - verschoben zugunsten der Proliferation.

Die generelle Reduktion von FLG in für GATA-3 gesilenceten Keratinozyten und Kontrollzellen auf mRNA-Ebene ist zudem interessant, weil an dieser Stelle deutlich wird, dass nicht nur die Prozessierung des großen Phosphoproteins Pro-FLG gestört ist, sondern bereits auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Andere Arbeitsgruppen beschreiben für vergleichbare Stimulationen sowohl die Herunterregulation von Pro-FLG-mRNA als auch abweichende Expression von prozessierenden Enzymen [115, 121]. Diese Arbeit bestätigt folglich, dass die Regulation nicht ausschließlich auf Ebene der Prozessierung stattfindet.

Auch auf Proteinebene ist die Expression von FLG unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen verändert. Trotz geringer Fallzahl ist eine ähnlich regulierte Expression von FLG unter den verschiedenen Konditionen auf Proteinebene im Vergleich zur mRNA-Ebene erkennbar. Die GATA-3 Defizienz führt auch hier zu einer reduzierten Expression des prozessierten FLG. Stärker herunterreguliert wird FLG zusätzlich durch die Th17-assoziierten inflammatorischen Bedingungen. Es fällt auf, dass die Herunterregulation unter den Th17-ähnlichen Bedingungen in der Tendenz für die GATA-3 gesilenceten Zellen stärker ausfällt als für die Kontrollzellen. Unter Th2-ähnlichen Konditionen ist die FLG-Expression im Vergleich zu den basalen Bedingungen weniger stark reduziert. Die Herunterregulation von FLG, die die GATA-3 gesilenceten Zellen erfahren, ist tendenziell stärker als die der Kontrollzellen. Statistisch signifikant zeigt sich hier der Unterschied der FLG-Expression von Kontrollzellen zu GATA-3 gesilenceten Zellen unter Th2-assoziiierter Inflammation ($p=0,0113$).

Unter der Fragestellung nach der Bedeutung von GATA-3 lässt sich schlussfolgern, dass GATA-3 in die Regulation der FLG-Expression involviert ist. Unter Berücksichtigung der Auswertung der Ergebnisse für die mRNA lässt sich die Annahme einer Regulation auf transkriptioneller Ebene bestätigen. In weiteren Experimenten wäre es von Interesse zu differenzieren, in welchem Maße zusätzlich zur Genregulation Aberrationen der Prozessierung des Polypeptids FLG-2 beitragen. Über die Regulation prozessierender Enzyme (wie Furin, Calpain oder Serinproteasen [116, 117]) könnte der Transkriptionsfaktor auf einer weiteren Ebene einen Effekt auf das FLG-Level besitzen. Erste Ergebnisse aus dem MA deuten darauf hin, dass ebenfalls die Expression der FLG-prozessierenden Enzyme beeinträchtigt ist. Zudem wäre es aufschlussreich zu erfahren, welche anderen Transkriptionsfaktoren regulierend auf die Promoterregion von FLG wirken oder ob die Promoterregion von FLG eine direkte Bindestelle für GATA-3 beinhaltet. Derzeit könnte hypothetisch ein direkter Einfluss des Transkriptionsfaktors auf die Genexpression von FLG angenommen werden.

Diese Ergebnisse zur Rolle von GATA3 in der Filaggrin Genregulation ergänzen bisherige Erkenntnisse, die sich primär auf die regulierenden Effekte von Zytokinen beziehen. Neben Effekten, die unmittelbar an der Regulation der Genexpression ansetzen weisen die Daten des Mikroarrays zusätzlich auf mögliche Effekte in der Prozessierung hin. So konnte im MA zusätzlich eine Herunterregulation der Genexpression für die prozessierenden Enzyme Furin, Calpain 1 und Calpain 10 für GATA3 gesilencete Keratinozyten unter Stimulation mit IL-22 und TNF α demonstriert werden.

5.2.1.2 *Loricrin*

Als relativ später Differenzierungsmarker gilt LOR, das als Protein spezifisch im *Str. granulosum* exprimiert wird. Als Hauptbestandteil des CE ist LOR von zentraler Bedeutung für die physiologische epidermale Barriere [13, 78, 99–101].

Die Untersuchungen dieser Arbeit zur Regulation der Expression von LOR wiesen Parallelen zu dem Expressionsmuster von FLG auf. Auf mRNA-Ebene zeigten die GATA-3 Defizienz und der Einfluss inflammatorischer Konditionen eine ähnlich veränderte Genexpression, im Sinne einer Herunterregulation, auf.

Tendenziell ließen sich in der qRT-PCR im Vergleich von Kontrollzellen zu GATA-3 gesilenceten Keratinozyten deutlich reduzierte Level an LOR bei GATA-3 Mangel nachweisen. Auch die Ergebnisse des mRNA Microarrays zeigen eine Herunterregulation der LOR-Expression auf mRNA-Ebene bei lentiviraler Transduktion mit GATA-3 shRNA. Neben dem Vergleich unter basalen Bedingungen wurden in der qRT-PCR ebenfalls inflammatorische Konditionen untersucht. Hier konnte unter Psoriasis-ähnlichen Bedingungen eine deutliche Herunterregulation der LOR-Expression demonstriert werden. Da die Level bis unter die Nachweisgrenze sanken, kann kein Vergleich mehr zwischen GATA-3 gesilenceten und nicht gesilenceten Zellen angestellt werden. Für die AD-assoziierte Inflammation war tendenziell eine Herunterregulation der LOR-Genexpression in den für GATA-3 gesilenceten Keratinozyten und den Kontrollzellen zu beobachten. In den für GATA-3 gesilenceten Keratinozyten schien es durch die AD-ähnliche Zytokinstimulation zu einer Verstärkung des negativ-regulatorischen

Effekts der Inflammation zu kommen. Sowohl AD- als auch Psoriasis-assoziiertes Zytokin-Milieu gingen mit einer gestörten Expression des Differenzierungs-assoziierten Proteins LOR einher. Der Mangel von GATA-3 führte in der Tendenz zu einer reduzierten LOR-Expression auf mRNA-Ebene. Die Expression des relativ späten Differenzierungsmarkers LOR könnte folglich in Abhängigkeit zu GATA-3 stehen. Es ist möglich, dass GATA-3 hier eine protektive Rolle in der Aufrechterhaltung der LOR-Expression und somit dem Differenzierungsverhalten der Keratinozyten zukommt.

Zudem scheinen weitere Regulationsmechanismen zu existieren, die unter inflammatorischen Konditionen die LOR-Expression weiter modellieren und mit den Effekten von GATA-3 interagieren. Die Komplexität der Genregulation ist anhand der Ergebnisse des mRNA Microarrays ersichtlich: Hier führt die Stimulation mit IL-22 und TNF α zu keinem weiteren Effekt in den GATA-3 gesilenceten Keratinozyten, während die mit *nonsense* shRNA transduzierten Zellen unter Stimulation mit IL-22 und TNF α ein deutlich reduziertes LOR-Level aufweisen.

Aus der Literatur sind komplexe Regulationsmechanismen der Expression von LOR bekannt. Die proximale Promoterregion in murinen Keratinozyten enthält eine Bindestelle für GATA-3 [13]. Es ist naheliegend auf eine Analogie zum menschlichen Genom zu schließen. Wie demonstriert, ist die Expression von LOR in primären humanen Keratinozyten abhängig von GATA-3. Bekannt ist aus den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Jang et al. der positiv regulatorische Effekt auf die Expression von LOR durch Sp1 und c-Jun als Teil von AP-1 in humanen Keratinozyten, zudem besteht ein Synergismus mit anderen Co-Aktivatoren [103]. Die Frage, inwiefern es zur Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren kommt, bzw. welche Faktoren für die LOR-Expression essentiell sind, muss an dieser Stelle vorerst unbeantwortet bleiben. Wie aus den Ergebnissen von mRNA Microarray und qRT-PCR ersichtlich wird, scheint GATA-3 jedoch zumindest Einfluss auf die LOR-Expression in primären humanen Keratinozyten zu nehmen.

5.2.1.3 *Involucrin*

Im Vergleich zu LOR war die Expression des Differenzierungsmarkers IVL, der bereits in früheren Phasen der Differenzierung exprimiert wird, weniger stark beeinträchtigt. Die Expression von IVL zeigte sich unter basalen Bedingungen in den für GATA-3 gesilenceten Keratinozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen in der qRT-PCR reduziert. Es war zu beobachten, dass die Psoriasis-ähnlichen Bedingungen die IVL-Expression in beiden Zellarten deutlich reduzierten, jedoch nicht bis unter die Nachweisgrenze. Auch AD-ähnliche Konditionen führten in der Tendenz zu reduzierten IVL-Leveln auf mRNA-Ebene. Das Silencing von GATA-3 hatte unter beiden beschriebenen inflammatorischen Bedingungen keinen signifikanten Effekt auf die Expression von IVL. Ähnliche Beobachtungen sind bei Betrachtung des mRNA Microarrays zu machen. Die Expression von IVL zeigte sich in den GATA-3 shRNA transduzierten Keratinozyten leicht reduziert. Die inflammatorischen Konditionen, erzeugt durch Stimulation mit IL-22 und TNF α , führten zu keinem eindeutigen Effekt auf die IVL-Expression.

Möglicherweise wird die Expression von IVL nur indirekt über GATA-3 reguliert. Aus der Literatur ist bekannt, dass die IVL-Expression im humanen Genom u.a. durch AP-1 und Sp1 reguliert wird [90]. Inwiefern es auch zu Interaktionen mit GATA-3 kommt, ist nicht bekannt. Weiterführende Analysen bezüglich der Frage nach Wechselwirkungen der verschiedenen Transkriptionsfaktoren stehen aus. Auch scheint die Expression des relativ frühen Differenzierungsmarkers weniger stark durch die Inflammation beeinträchtigt zu sein als beispielsweise die Expression von LOR oder FLG. Dennoch lässt sich beobachten, dass die Differenzierung der Keratinozyten sich unter inflammatorischen Konditionen bereits in frühen Stadien beeinträchtigt zeigt.

5.2.1.4 Zusammenfassung: Regulation der Differenzierungsmarker

Es ist aufgrund der eigenen und bereits publizierten Ergebnisse anzunehmen, dass GATA-3 in der terminalen Differenzierung der Keratinozyten eine koordinierende Funktion zukommt. Zu dieser Annahme passend sind Ergebnisse, die die Retardierung der Expression verschiedener Differenzierungsmarker beschreiben, die auch in dieser Arbeit betrachtet wurden: Ist die Expression der Differenzierungsmarker in der Epidermis verändert, kann es zu Störungen der Integrität der epidermalen Barriere kommen. Grund hierfür ist die Beteiligung einiger Proteine an der Synthese des CE. LOR und IVL sind beispielsweise zentrale Bestandteile des Proteingerüsts, das in den Korneozyten etabliert wird [114]. Hervorzuheben ist auch die Bedeutung von FLG, das als Protein für die Entwicklung physiologisch-regelrechter Korneozyten essentiell ist [101, 122]. In dieser Arbeit ergaben sich Hinweise auf die Existenz von Mechanismen, die die Expression von FLG über GATA-3 regulieren. Bei veränderter Expression oder ausbleibender Prozessierung kann die regelrechte Ausgestaltung des CE beeinträchtigt sein. Außerdem ergaben sich deutliche Hinweise, dass auch die Expression weiterer Differenzierungs-assoziiierter Proteine bei Mangel an GATA-3 beeinträchtigt ist. Eine Abhängigkeit der Integrität der epidermalen Barriere zu einer regelrechten Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 ist anzunehmen.

Es konnte beobachtet werden, dass der Effekt des GATA-3 Mangels primär für die Proteine, die im terminalen Differenzierungsprozess exprimiert werden, bedeutsam ist. Potentiell erklärbar ist diese Beobachtung über eine reduzierte Aktivierung des IKK- α -Komplexes, dessen Bedeutung für eine physiologische Barrierefunktion der Epidermis nicht zu unterschätzen ist [61].

Wird die Expression der Differenzierungsmarker in den für GATA-3 gesilenceten Keratinozyten unter den Bedingungen chronisch-entzündlicher Hauterkrankungen betrachtet, ist zu bemerken, dass deren Genaktivierung zusätzlich durch komplexe Interaktionen von Zytokin-vermittelten Signalwegen stark beeinflusst wird. Dies zeigte sich insbesondere unter AD-ähnlichen Bedingungen in Bezug auf die Regulation der FLG-Expression. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich der für GATA-3 gesilenceten Keratinozyten zu den Kontrollzellen. Durch das Silencing konnte eine stärkere Herunterregulation der Genexpression von FLG demonstriert werden.

Insbesondere unter AD-ähnlichen Konditionen scheint die Expression der Proteine des terminalen Differenzierungsprozesses (FLG, LOR) - zusätzlich zu regulierenden Effekten durch die Inflammation - durch den Transkriptionsfaktor GATA-3 modelliert zu werden. Wie weiterführende Arbeiten von Zeitvogel et al. zeigen, ist GATA-3 in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis herunterreguliert [263]. In Hinblick auf ein verändertes Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors GATA-3 in chronisch entzündlichen Hauterkrankungen, sind Schlussfolgerungen bezüglich der Bedeutung von GATA-3 möglich. Die gestörte Enddifferenzierung der Keratinozyten bei GATA-3-Mangel kann als mögliche Erklärung für die Beeinträchtigung der epidermalen Barriere dienen. Die Dysregulation der Immunreaktion mit Dominanz von Th2-assoziierten Zytokinen führt unter dieser Annahme zu einer Aufrechterhaltung der Permeabilitätsstörung bei Ausbleiben der Induktion von GATA-3. Gleichzeitig macht der Einfluss von GATA-3 deutlich, dass es sich bei dem Transkriptionsfaktor unter einem therapeutischen Aspekt um einen potentiellen Ansatzpunkt handeln könnte. Bei Beeinflussung der GATA-3-Dysregulation könnte der damit einhergehenden Dysregulation der Differenzierungsmarker durch Zytokine an dieser Stelle entgegengewirkt werden.

Im Unterschied zur atopischen Dermatitis ist bei Psoriasis eine andere Achse des Immunsystems von zentraler Bedeutung: Pathophysiologisch dominiert eine exzessive, unkontrollierte Th17-Immunantwort [266]. Bekannt ist bereits, dass die Barrierefunktion bei Patienten mit Psoriasis abnorm verändert ist [255]. Diese Arbeit stützt die Betrachtung von Psoriasis als „Barriere-Erkrankung“: Besonders die Psoriasis-ähnliche Kondition (TNF α , IL-22, IL-17 und OSM) scheint nicht mit einer ungestörten Differenzierung der Keratinozyten vereinbar. In der qRT-PCR zeigten sich die mRNA-Level von FLG, LOR und IVL sowohl in den Kontrollzellen als auch in den für GATA-3 gesilenceten Keratinozyten deutlich reduziert. Es kommt insgesamt zu einer stärkeren Regulation der Differenzierungsmarker in den Kontrollzellen sowie in den für GATA-3 gesilenceten Zellen. Die Expressionslevel der Strukturproteine LOR und IVL unterschieden sich im Vergleich zu den AD-ähnlichen Konditionen zwischen den Kontrollzellen und den für GATA-3 gesilenceten Keratinozyten weniger stark. In Hinblick auf die Pathophysiologie ist die Interpretation – Psoriasis als „Barriere-Erkrankung“ – mit der Annahme komplexer Interaktionen zwischen Immunzellen, die TNF α , IL-22, IL-17 und OSM sezernieren, und Keratinozyten stimmig. Unter Th17-bedingter Entzündung ist die Differenzierung der Keratinozyten gestört und die Beeinträchtigung der Integrität der epidermalen Barriere somit möglich.

Da die Expression sowohl in den Kontrollzellen als auch bei GATA-3 Defizienz reduziert ist, kann nicht auf selektive Regulationsmechanismen über GATA-3 geschlossen werden. Der Transkriptionsfaktor wird selbst durch die Th17-assoziierten Konditionen herunterreguliert, scheint jedoch für den negativ-regulatorischen Effekt der Zytokine nicht essentiell. Die Herunterregulation von GATA-3 könnte die Repression der Differenzierungsmarker weiter verstärken, unter Th17-ähnlichen Konditionen scheint jedoch der negativ-regulatorische Effekt der inflammatorischen Konditionen zu dominieren.

Die lichtmikroskopische Kontrolle der unter Psoriasis-ähnlichen Konditionen kultivierten Keratinozyten veranschaulicht dies: Die Keratinozyten weisen hier eine stark veränderte Morphologie auf. Es ist anzunehmen, dass das variierende Expressionsmuster der Differenzierungsmarker nicht nur die Synthese des CE beeinflusst, sondern ebenfalls die physiologische Morphologie der differenzierenden Keratinozyten beeinträchtigt.

5.2.1.5 Kallikreine – Desquamation

Kallikreine (KLK) gehören zur Gruppe der Serin-Proteasen, die generell die Umwandlung von Kininogenen zu Kininen katalysieren. In der Epidermis sind sie an der enzymatischen Regulation der Desquamation beteiligt und tragen somit zur regelrechten (Schutz-)Funktion der Epidermis bei. Die *Desquamatio* erfordert den Abbau von Corneodesmosomen um die Ablösung der obersten Zellen zu ermöglichen [267–270]. Während KLK5 und KLK7 die Degradation von Corneodesmosin bewirken, sind KLK1 und KLK11 am Abbau von Desmoglein-1 beteiligt [26, 271, 272].

Die Promoterregion von KLK1 weist im humanen Genom zwei regulierende Bindestellen für den Transkriptionsfaktor GATA-3 auf. GATA-3 ist folglich auf transkriptioneller Ebene in die Regulierung der Desquamation über die Expression der Serinprotease KLK1 involviert [255]. Die durch Son et al. [255] beschriebene Induktion von KLK1 durch GATA-3 konnte auch in dieser Arbeit in der qRT-PCR demonstriert werden. Die KLK1-Induktion war tendenziell in den mit GATA-3 shRNA transduzierten Zellen geringer. Eine mögliche Erklärung für die nicht vollständig unterdrückte Induktion der KLK1-Expression sind weitere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Promoterregion, die neben der direkten Regulation durch GATA-3 auf die Expression von KLK1 wirken und die Induktion durch GATA-3 zumindest partiell ersetzen können. Zudem schränken Unterschiede im experimentellen Setting die Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Son et al. ein. So führten Son et al. zur Analyse der KLK1-Promoterregion einen Reporter-gen-Assay durch, sie verwendeten kommerziell vertriebene *Normal Human Epidermal Keratinocytes* (NHEK). Dennoch ist anzunehmen, dass GATA-3 über die transkriptionelle Regulation von KLK1 in die Koordination der Desquamation involviert ist.

5.2.1.6 Defekte in der Lipidbiosynthese

In dieser Arbeit ergaben sich Hinweise auf die Beeinträchtigung der Lipidbiosynthese in GATA-3 defizienten primären humanen Keratinozyten. Der mRNA Microarray zeigte etwa eine deutliche Regulation des Enzyms AGPAT6 auf. GATA-3 reguliert die Lipidbiosynthese der Epidermis einerseits also direkt über die Expression von Lipid-prozessierenden Enzymen. Zum anderen kommt es durch Störungen der epidermalen Barriere wie oben beschrieben zur Dysregulation des pH-Wertes in der Epidermis. Zentrale Enzyme werden durch einen relativ sauren pH aktiviert und sind so in ihrer enzymatischen Aktivität bei steigendem pH beeinträchtigt. Ein Einfluss von GATA-3 auf die Lipidkomponente des CE ist folglich anzunehmen, nähere Betrachtungen sind hier sicherlich vielversprechend. Dementsprechend ist GATA-3 auch unter dem Aspekt der regelrechten Lipidbiosynthese an der Entstehung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere beteiligt.

An dieser Stelle ergibt sich ein Hinweis darauf, dass die Dysregulation der Lipidkomposition in chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen zumindest partiell sekundär bedingt sein könnte. Änderungen der Lipidkomponenten der Epidermis ständen folglich nicht zu Beginn der Erkrankung, sondern würden sich als Konsequenz aus veränderter Expression entsprechender Transkriptionsfaktoren und prozessierender Enzyme ableiten. Stimmig mit dieser Hypothese sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Racz et. al, die reduzierte GATA-3-Level bei Psoriasis nachwiesen [59], sowie der Nachweis von reduzierten GATA-3 Leveln bei atopischer Dermatitis von Zeitvogel et al. [263]. Die Arbeitsgruppe um Strong et. al demonstrierte wiederum, dass reduzierte Level von GATA-3 zu einer Dysregulation der Lipidkomponente der Epidermis führen [63]. Beeinträchtigungen der GATA-3 Expression sind folglich in die Pathophysiologie von Psoriasis und atopischer Dermatitis involviert. Die Dysregulation des Transkriptionsfaktors führt durch Lipiddysregulation zu Störungen der epidermalen Barriere.

Lipide tragen entscheidend zur Integrität der epidermalen Barriere bei. Sie sind nicht nur durch die Lipidhülle, die den CE umgibt, involviert, sondern auch als Hauptbestandteil der EZM essentiell. Die Zusammensetzung der extrazellulären Lipidmatrix ist wie folgt beschrieben [273]:

- 50% Ceramide
- 25% Cholesterin
- 15% freie Fettsäuren
- wenig Phospholipide.

In der extrazellulären Matrix werden die Lipide in lamellaren Strukturen organisiert, so dass sie parallel zur Zelloberfläche angeordnet sind und diese wie eine Hülle umgeben. Die lamellaren Strukturen dienen insbesondere dem Schutz vor Dehydratation und Elektrolytverlust [273]. Während des Differenzierungsprozesses kommt es in *Str. spinosum* und *Str. granulosum* zur Synthese von Lipiden, die per Exozytose in den extrazellulären Raum freigesetzt werden [97, 274]. Um ihrer Funktion im extrazellulären Raum nachkommen zu können, müssen die zunächst polaren Moleküle so modifiziert werden, dass sie keine Polarität mehr aufweisen [125]. Enzyme für den Umwandlungsprozess sind Epidermis-spezifisch und werden ebenfalls in den Vesikeln gespeichert und zusammen mit den Lipiden sezerniert [273, 275, 276]. Kommt es durch Beeinträchtigung der epidermalen Barriere zur Erhöhung des pH-Wertes, ist die Lipid-Prozessierung gestört. Die Folge sind fehlerhafte Prozessierung, veränderte Lipid-Komposition und Dysregulation der lamellaren Strukturen [113]. Für die Pathophysiologie der Psoriasis sind Dysregulationen der Lipidbiosynthese beschrieben [277, 278]. Die Erkrankung geht mit Veränderungen des Ceramid-Gehalts in der Epidermis einher [279]. An dieser Stelle wird deutlich, dass die Betrachtung der Lipidbiosynthese in Hinblick auf chronisch-entzündliche Hauterkrankungen nicht zu vernachlässigen ist. Unbeantwortet muss die Frage bleiben, ob Aberrationen der Lipidkomposition primär oder sekundär entstehen.

Die Arbeitsgruppe um de Guzman-Strong et al. machte die Lipiddefekte der epidermalen Barriere zum zentralen Gegenstand ihrer Arbeit und demonstrierte deutliche Defekte in der

Lipidbiosynthese bei Mangel an GATA-3. Auch zeigten sie im murinen Modell eine makroskopisch deutlich veränderte Epidermis mit funktionellem Verlust auf [63].

Die epidermale Barriere kann folglich bei Defizienz von GATA-3 auf mehreren Ebenen in ihrer Integrität beeinträchtigt sein. In Hinblick auf die Situation *in vivo* kann die Schutzfunktion, die der epidermalen Barriere zukommt, nicht mehr aufrechterhalten werden. Der Verlust der Barrierefunktion wirkt sich wiederum auf verschiedenen Ebenen potentiell gefährlich für das Individuum aus. Physikalischen Belastungen kann mit weniger Resilienz begegnet werden: Sowohl verstärkte Dehydratation als auch geringerer Schutz vor genotoxischer UV-Strahlung sind möglich. Bei Beeinträchtigung der Integrität der Barrierefunktion, ist ebenfalls die Penetration der Epidermis durch infektiöse, inflammatorische und allergische Partikel erleichtert. Kontinuierliche Stimuli erhalten die Entzündungsreaktion aufrecht. Bei Dysregulation (wie Erkrankung an AD oder Psoriasis) des Immunsystems kann es so zur Chronifizierung der Inflammation kommen.

5.2.2 S100-Proteine

Interessant wären auch weiterführende Betrachtungen der S100-Proteine. Den Mitgliedern der S100-Protein-Familie werden zahlreiche Funktionen zugesprochen. Eine Bedeutung scheint ihnen in der Regulation der epidermalen Homöostase und der Reaktion auf epidermalen Stress zuzukommen. Entsprechend wurde beschrieben, dass die Level der S100-Proteine unter inflammatorischen Bedingungen mit Th1-/Th17-Assoziation kompensatorisch erhöht sein können [113]. Für die Stimulation mit IL-17 ist eine kompensatorische Heraufregulation der Gene S100A8 sowie S100A9 beschrieben [121]. Die Stimulation mit IL-22 führt zu einer erhöhten Genexpression von S100A8 und S100A9 [113].

S100A12 wird eine Bedeutung in entzündlichen Prozessen über den *receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE) zugesprochen [280]. In gesunder Haut ist S100A12 nicht exprimiert. Während inflammatorischer Prozesse kann S100A12 von neutrophilen Granulozyten sezerniert werden [278]. Die Expression ist in suprabasalen und follikulären Keratinozyten erythemato-squamöser Psoriasis beschrieben [266].

In dem für diese Arbeit durchgeführten mRNA Microarray konnte unter inflammatorischen Konditionen, das bedeutet bei Stimulation mit IL-22 und TNF α , eine deutliche Induktion der S100A12 mRNA unter GATA-3 Silencing beobachtet werden. Ein regulatorischer Effekt durch IL-22 und TNF α konnte ebenfalls in Bezug auf S100A10 bei GATA-3 *knock down* demonstriert werden. Das Protein S100A10 ist im *Str. basale* und *Str. spinosum* der Epidermis lokalisiert. Es ist eine Komponente des Calpactin I Komplexes, eine Rolle im Differenzierungsprozess der Keratinozyten wird angenommen. Diskutiert wird eine Bedeutung für die Regulation der Proliferation vor dem Hintergrund einer positiven Korrelation mit Ki67 [281].

Eine genauere Betrachtung der Genexpression anhand ihrer Funktion ausgewählter Mitglieder der S100-Protein-Familie wäre für AD- und Psoriasis-ähnliche Konditionen aufschlussreich.

Über einen Effekt von GATA-3 auf Proteine der S100-Familie kommt es zur Modulation des Differenzierungsprozesses der Keratinozyten und der Entzündungsmediation. GATA-3 scheint ebenfalls auf diese Weise Einfluss auf die Integrität der epidermalen Barriere zu nehmen [113]. Die S100-Proteine sind Teil einer Untergruppe des *epidermal differentiation complex gene cluster*. Auch wenn die Funktion der einzelnen S100-Proteine noch nicht vollständig erforscht ist, geht die Wissenschaft aktuell von einer Beteiligung am Prozess der Keratinisierung aus [101, 254, 282]. Es ergibt sich ein weiterer Hinweis auf die Komplexität der Interaktion von GATA-3 mit dem *epidermal differentiation complex gene cluster*.

5.2.3 GATA-3 – immunologische Bedeutung: Analogien zwischen Th-Zellen und Keratinozyten

Eine Bedeutung in der Immunologie kommt dem Transkriptionsfaktor GATA-3 auf verschiedenen Ebenen zu. Als zentraler Transkriptionsfaktor für die Differenzierung naiver Th0-Zellen zu Th2-Zellen agiert GATA-3 als wichtiger Akteur im Immunsystem [283]. Auch für die Differenzierung zu Th9-Zellen ist GATA-3 essentiell [194, 284]. Immunologisch bedeutsam ist der Transkriptionsfaktor jedoch ebenfalls über die Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere.

Die Bedeutung von GATA-3 in der Differenzierung zu Th2-Zellen hat seit der Arbeit von Zheng und Flavell im Jahr 1997 zunehmend an Interesse gewonnen [24]. Wenn sich diese Arbeit auch nicht explizit mit der Rolle von GATA-3 in Th2-Zellen beschäftigt, ist der Vergleich dennoch von Interesse. Die Regulationsmechanismen der Expression von GATA-3 in den Th2-Zellen sind insgesamt bis dato Gegenstand zahlreicher Arbeiten gewesen [49–52, 54], so dass sich die Frage nach Parallelen und Unterschieden zur Genexpression in den Keratinozyten stellt. Nicht zuletzt auf Grund der momentan noch begrenzten Erkenntnisse über Regulationsmechanismen von GATA-3 in Keratinozyten, sind auf diesem Gebiet noch viele Fragen zu beantworten. Insbesondere in Hinblick auf synergistische Effekte in der Epidermis durch Zellen des Immunsystems und Keratinozyten (wie etwa die Induktion des IL-4/STAT6-Signalweges [36, 285]) sind weiterführende Analysen angebracht.

Generell nimmt GATA-3 in Th-Zellen eine Rolle in der Kontrolle von Zellteilung und Zelldifferenzierung ein [29, 283]. Diese Funktion als kontrollierende Instanz ist auch in den Keratinozyten der Epidermis zu beobachten. Hier spielt GATA-3 speziell bei der Koordination des Differenzierungsprozesses eine wichtige Rolle [1, 60].

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung, die dem Transkriptionsfaktor GATA-3 in der Etablierung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere zukommt.

GATA-3 wurde in Hinblick auf atopische Konditionen primär in seiner immunologischen Bedeutung in der Differenzierung von naiven Th0-Zellen zu Th2-Lymphozyten über Aktivierung des IL-4/STAT6-Signalweges diskutiert.

Zahlreiche Studien zeigten die Relevanz von GATA-3 speziell im Hinblick auf die Induktion der Th2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Dagegen ist die Rolle, die GATA-3 in der Differenzierung von Keratinozyten in der Epidermis zukommt, bisher wenig untersucht. Dem Transkriptionsfaktor wird hier ein positiv-regulatorischer Effekt auf die Differenzierung der epidermalen Keratinozyten zugesprochen sowie eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation.

Von hohem Interesse ist die Bedeutung von GATA-3 daher insbesondere unter dem Aspekt chronisch-entzündlicher Hautkrankheiten mit epidermaler Beteiligung, da hier epidermal sowohl Keratinozyten als auch Lymphozyten in die Pathophysiologie involviert sind und unter dem Einfluss sezernierter Zytokine stehen.

In dieser Arbeit wurden primäre humane Keratinozyten, die via lentiviraler Transduktion für den Transkriptionsfaktor GATA-3 gesilenced wurden, im Detail untersucht. Zu Beginn der Arbeit wurde eine Transkriptionsanalyse mittels mRNA Microarray zur Evaluation durchgeführt, welche Gene durch die lentivirale Transduktion mit GATA-3 shRNA reguliert werden. Die im Folgenden angewandte Methodik der qRT-PCR ermöglichte die Betrachtung der Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 sowie ausgewählter Strukturproteine früher und später Differenzierungsstadien auf mRNA-Ebene. Für Untersuchungen auf Proteinebene kamen immunhistochemische Färbungen und Analysen mittels Western Blot zur Anwendung. Es wurde ein Stimulationsschema etabliert, das den Vergleich der Genexpression von GATA-3 und den Strukturproteinen des *cornified envelope* unter basalen Bedingungen mit der Situation in akuten Läsionen der atopischen Dermatitis (Th2-assoziierte Inflammation: IL-4 und IL-13) sowie der Psoriasis (Th1-/Th17-assoziierte Inflammation: TNF α , IL-17, OSM, IL-22) ermöglichte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass GATA-3 regulierend an der Expression der mit der Differenzierung assoziierten Proteine beteiligt ist. Insbesondere in Bezug auf die Expression des zentralen Hautbarriereproteins Filaggrin (FLG) konnte ein positiv-regulatorischer Effekt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Auch für die Hautbarriereproteine Loricrin (LOR; exprimiert im *Str. granulosum* der Epidermis) und Involucrin (IVL; vor allem im *Str. spinosum* der Epidermis exprimiert) kann ein positiv-regulatorischer Effekt durch GATA-3 angenommen werden. So war die Expression der Proteine bei GATA-3 Defizienz tendenziell herunterreguliert. Generell ist somit durch eine

veränderte Zusammensetzung des *cornified envelope* eine zentrale Komponente der epidermalen Barriere bei GATA-3 Defizienz beeinträchtigt.

Interessanterweise konnten zahlreiche weitere Gene identifiziert werden, deren Expression durch GATA-3 Defizienz verändert ist. Insbesondere zählen hierzu ribosomale Proteine sowie Mitglieder der S100-Protein-Familie, die wie die o.g. Strukturproteine dem *epidermal differentiation complex gene cluster* zuzuordnen sind.

Somit ergibt sich experimentell ein Hinweis darauf, dass der Transkriptionsfaktor GATA-3 besonders unter inflammatorischen Konditionen von Bedeutung für die epidermale Barriere ist. Die Herunterregulation von GATA-3 unter Bedingungen der Psoriasis konnte im gewählten experimentellen Setting demonstriert werden und war mit einer Herunterregulation wichtiger Strukturproteine assoziiert. In akuten Läsionen der atopischen Dermatitis dominiert ein Th2-bedingtes Entzündungsmilieu. Unter Simulation dieser AD-ähnlichen Bedingungen kam es bei GATA-3 Defizienz zu einer statistisch signifikanten Herunterregulation von FLG sowie zu einer tendenziell reduzierten Expression von LOR und IVL. Hervorzuheben ist die Beobachtung, dass unter Th2-assoziiierter Inflammation in den Keratinozyten das FLG-Level grundsätzlich reduziert ist. In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass der Mangel an GATA-3 in humanen Keratinozyten zu einer signifikant verstärkten Herunterregulation der FLG-Expression unter Th2-assoziiierter Inflammation führt. Als mögliche Erklärung könnte die fehlende Induzierbarkeit von GATA-3 in GATA-3 defizienten Keratinozyten dienen.

Eine komplexe Interaktion von Regulationsmechanismen der Genexpression zentraler Strukturproteine, mit Beteiligung von GATA-3 mit dem *epidermal differentiation complex gene cluster*, ist anzunehmen.

7 Literaturverzeichnis

1. Chikh A, Sayan E, Thibaut S, Lena AM, DiGiorgi S, Bernard BA, et al. Expression of GATA-3 in epidermis and hair follicle: Relationship to p63. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;361:1–6.
2. Tsai F-Y, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood.* 1997;89:3636–43.
3. Grépin C, Nemer G, Nemer M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development (Cambridge).* 1997;124:2387–95.
4. Gove C, Walmsley M, Nijjar S, Bertwistle D, Guille M, Partington G, et al. Overexpression of GATA-6 in *Xenopus* embryos blocks differentiation of heart precursors. *EMBO J.* 1997;16:355–68.
5. Ku C-J, Hosoya T, Maillard I, Engel JD. GATA-3 regulates hematopoietic stem cell maintenance and cell-cycle entry. *Blood.* 2012;119:2242–51.
6. Tsarovina K, Reiff T, Stubbusch J, Kurek D, Grosveld FG, Parlato R, et al. The Gata3 transcription factor is required for the survival of embryonic and adult sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 2010;30:10833–43.
7. Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, et al. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat. Genet.* 1995;11:40–4.
8. Debacker C, Catala M, Labastie M-C. Embryonic expression of the human GATA-3 gene. *Mech. Dev.* 1999;85:183–7.
9. Labastie M-C, Catala M, Gregoire J-M, Peault B. The GATA-3 gene is expressed during human kidney embryogenesis. *Kidney Int.* 1995;47:1597–603.
10. Zhou M, Ouyang W. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol. Res.* 2003;28:25–37.
11. Ting C-N, Olson MC, Barton KP, Leiden JM. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature.* 1996;384:474–5.
12. George KM, Leonard MW, Roth ME, Lieu KH, Kioussis D, Grosveld F, Engel JD. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development (Cambridge).* 1994;120:2673–86.
13. Kawachi Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Otsuka F. GATA-3 regulates differentiation-specific loricrin gene expression in keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2012;21:859–64.
14. Yamamoto M, Ko LJ, Leonard MW, Beug H, Orkin SH, Engel JD. Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev.* 1990;4:1650–62.
15. Ranganath S, Murphy KM. Structure and specificity of GATA proteins in Th2 development. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21:2716–25.
16. Bonin F, Molina M, Malet C, Ginestet C, Berthier-Vergnes O, Martin MT, Lamartine J. GATA3 is a master regulator of the transcriptional response to low-dose ionizing radiation in human keratinocytes. *BMC Genomics.* 2009;10:417.

17. Martin, D. I. K., Orkin SH. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev.* 1990;4:1886–98.
18. Pedone PV, Omichinski JG, Nony P, Trainor C, Gronenborn AM, Clore GM, Felsenfeld G. The N-terminal fingers of chicken GATA-2 and GATA-3 are independent sequence-specific DNA binding domains. *EMBO J.* 1997;16:2874–82.
19. Morrissey EE, Ip HS, Lu MM, Parmacek MS. GATA-6: A zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev. Biol.* 1996;177:309–22.
20. Oosterwegel M, Timmerman J, Clevers H, Leiden J. Expression of Gata-3 During Lymphocyte Differentiation and Mouse Embryogenesis. *Dev. Immunol.* 1992;3:1–11.
21. Kornhauser JM, Leonard MW, Yamamoto M, LaVail JH, Mayo KE, Engel JD. Temporal and spatial changes in GATA transcription factor expression are coincident with development of the chicken optic tectum. *Mol. Brain Res.* 1994;23:100–10.
22. Zon LI, Mather C, Burgess S, Bolce ME, Harland RM, Orkin SH. Expression of GATA-binding proteins during embryonic development in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991;88:10642–6.
23. Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Lu MM, Parmacek MS. GATA-5: A transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev. Biol.* 1997;183:21–36.
24. Zheng W-P, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 1997;89:587–96.
25. Ise W. Development and function of follicular helper T cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016;80:1–6.
26. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989;7:145–73.
27. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2015;74:5–17.
28. Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell RA. Polarization of IL-4- and IFN- γ -Producing CD4 + T Cells Following Activation of Naive CD4 + T Cells. *J. Immunol.* 1997;158:1085–94.
29. Coffman RL, Mocci S, O'Garra A. The stability and reversibility of Th1 and Th2 populations: Current Topics in Microbiology and Immunology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999;238:1–12.
30. Hendriks RW, Nawijn MC, Engel JD, van Doorninck H, Grosveld F, Karis A. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur. J. Immunol.* 1999;29:1912–8.
31. Leiden JM. Transcriptional regulation of T cell receptor genes. *Annu. Rev. Immunol.* 1993;11:539–70.
32. Clevers H, Ferrier P. Transcriptional control during T-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 1998;10:166–71.

33. Chatila TA, Li N, Garcia-Lloret M, Kim H-J, Nel AE. T-cell effector pathways in allergic diseases: Transcriptional mechanisms and therapeutic targets. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008;121:812–23.
34. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: Induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 2006;16:3–10.
35. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: The T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.* 2000;14:1693–711.
36. Zhang D-H, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J. Biol. Chem.* 1997;272:21597–603.
37. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4- independent mechanism. *Immunity.* 1998;9:745–55.
38. Kaplan MH, Wurster AL, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6-dependent and -independent pathways for IL-4 production. *J. Immunol.* 1999;163:6536–40.
39. Zhou M, Ouyang W, Gong Q, Katz SG, White JM, Orkin SH, Murphy KM. Friend of GATA-1 represses GATA-3-dependent activity in CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 2001;194:1461–71.
40. Ouyang W, Löhning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity.* 2000;12:27–37.
41. Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses. *Nat. Immunol.* 2004;5:1157–65.
42. Ranganath S, Ouyang W, Bhattacharya D, Sha WC, Grupe A, Peltz G, Murphy KM. Cutting edge: GATA-3-dependent enhancer activity in IL-4 gene regulation. *J. Immunol.* 1998;161:3822–6.
43. Ho I-C, Lo D, Glimcher LH. c-maf Promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J. Exp. Med.* 1998;188:1859–66.
44. Ho I-C, Tai T-S, Pai S-Y. GATA3 and the T-cell lineage: Essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9:125–35.
45. Schwenger, G. T. F., Fournier R, Kok CC, Mordvinov VA, Yeoman D, Sanderson CJ. GATA-3 Has Dual Regulatory Functions in Human Interleukin-5 Transcription. *J. Biol. Chem.* 2001;276:48502–9.
46. Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, Scott FW. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: Predominant role of GATA-3. *J. Immunol. Methods* 2003;278:157–69.
47. Siegel MD, Zhang D-H, Ray P, Ray A. Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cells requires the GATA-3 and CLEO elements. *J. Biol. Chem.* 1995;270:24548–55.
48. Zhang D-H, Yang L, Ray A. Cutting edge: Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *J. Immunol.* 1998;161:3817–21.

49. Lavenu-Bombled C, Trainor CD, Makeh I, Romeo P-H, Max-Audit I. Interleukin-13 gene expression is regulated by GATA-3 in T cells: Role of a critical association of a GATA and two GATG motifs. *J. Biol. Chem.* 2002;277:18313–21.
50. Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell.* 1997;90:109–19.
51. Lu J-R, McKinsey TA, Xu H, Wang D-Z, Richardson JA, Olson EN. FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19:4495–502.
52. Tevosian SG, Deconinck AE, Cantor AB, Rieff HI, Fujiwara Y, Corfas G, Orkin SH. FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96:950–5.
53. Svensson EC, Tufts RL, Polk CE, Leiden JM. Molecular cloning of FOG-2: A modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96:956–61.
54. Zang YS, Fang Z, Liu YA, Li B, Xiu QY. Repressor of GATA-3 can negatively regulate the expression of T cell cytokines through modulation on inducible costimulator. *Chin. Med. J.* 2012;125:2188–94.
55. Miaw S-C, Choi A, Yu E, Kishikawa H, Ho I-C. ROG, repressor of GATA, regulates the expression of cytokine genes. *Immunity.* 2000;12:323–33.
56. Das J, Chen C-H, Yang L, Cohn L, Ray P, Ray A. A critical role for NF- κ B in Gata3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation: *Nature Immunology.* *Nat. Immunol.* 2001;2:45–50.
57. Kaufman CK, Zhou P, Pasolli HA, Rendl M, Bolotin D, Lim K-C, et al. GATA-3: An unexpected regulator of cell lineage determination in skin. *Genes Dev.* 2003;17:2108–22.
58. Sellheyer K, Krah D. Expression pattern of GATA-3 in embryonic and fetal human skin suggests a role in epidermal and follicular morphogenesis. *J. CUTANEOUS PATHOL.* 2010;37:357–61.
59. Rácz E, Kurek D, Kant M, Baerveldt EM, Florencia E, Mourits S, et al. GATA3 expression is decreased in psoriasis and during epidermal regeneration; induction by narrow-band UVB and IL-4. *PLoS ONE* 2011.
60. Masse I, Barbolat-Boutrand L, Kharbili ME, Berthier-Vergnes O, Aubert D, Lamartine J. GATA3 inhibits proliferation and induces expression of both early and late differentiation markers in keratinocytes of the human epidermis: *Archives of Dermatological Research.* *Arch. Dermatol. Res.* 2014;306:201–8.
61. Candi E, Terrinoni A, Rufini A, Chikh A, Lena AM, Suzuki Y, et al. p63 is upstream of IKK α in epidermal development. *J. Cell. Sci.* 2006;119:4617–22.
62. Kurek D, Garinis GA, van Doorninck JH, van der Wees J, Grosveld FG. Transcriptome and phenotypic analysis reveals Gata3-dependent signalling pathways in murine hair follicles. *Development (Cambridge).* 2007;134:261–72.
63. Strong, C. D. G., Wertz PW, Wang C, Yang F, Meltzer PS, Andl T, et al. Lipid defect underlies selective skin barrier impairment of an epidermal-specific deletion of Gata-3. *J. Cell Biol.* 2006;175:661–70.

64. Descargues P, Sil AK, Karin M. IKK α , a critical regulator of epidermal differentiation and a suppressor of skin cancer. *EMBO J.* 2008;27:2639–47.
65. Koster MI, Roop DR. p63 and epithelial appendage development. *Differentiation.* 2004;72:364–70.
66. Mills AA, Zheng B, Wang X-J, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.* 1999;398:708–13.
67. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 1999;398:714–8.
68. Candi E, Rufini A, Terrinoni A, Dinsdale D, Ranalli M, Paradisi A, et al. Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: Selective genetic complementation in p63 null mice. *Cell Death Differ.* 2006;13:1037–47.
69. Marinari B, Ballaro C, Koster MI, Giustizieri ML, Moretti F, Crosti F, et al. IKK α is a p63 transcriptional target involved in the pathogenesis of ectodermal dysplasias. *J. Invest. Dermatol.* 2009;129:60–9.
70. Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ, Roop DR. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* 2004;18:126–31.
71. Li Q, Lu Q, Hwang JY, Büscher D, Lee K-F, Izpisua-Belmonte JC, Verma IM. IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev.* 1999;13:1322–8.
72. Hu Y. Abnormal Morphogenesis but Intact IKK Activation in Mice Lacking the IKK α Subunit of I κ B Kinase. *Science.* 1999;284:316–20.
73. Sil AK, Maeda S, Sono Y, Roop DB, Karin M. I κ B kinase- α acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature.* 2004;428:660–4.
74. Fuchs E, Nowak JA. Building epithelial tissues from skin stem cells: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 2008;73:333–50.
75. Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 1982;95:580–8.
76. Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell.* 1980;19:1033–42.
77. Rice RH, Green H. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: Activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell.* 1979;18:681–94.
78. Mehrel T, Hohl D, Rothnagel JA, Longley MA, Bundman D, Cheng C, et al. Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell.* 1990;61:1103–12.
79. Fisher C, Haydock PV, Dale BA. Localization of profilaggrin mRNA in newborn rat skin by in situ hybridization. *J. Invest. Dermatol.* 1987;88:661–4.
80. Rothnagel JA, Mehrel T, Idler WW, Roop DR, Steinert PM. The gene for mouse epidermal filaggrin precursor. Its partial characterization, expression, and sequence of a repeating filaggrin unit. *J. Biol. Chem.* 1987;262:15643–8.
81. Fuchs E. Skin stem cells: Rising to the surface. *J. Cell Biol.* 2008;180:273–84.

82. Denning MF. Epidermal keratinocytes: Regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36:1141–6.
83. Wittmann M, Werfel T. Interaction of keratinocytes with infiltrating lymphocytes in allergic eczematous skin diseases. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2006;6:329–34.
84. Lebre MC, van der Aar AMG, van Baarsen L, van Capel TMM, Schuitemaker, J. H. N., Kapsenberg ML, Jong EC de. Human keratinocytes express functional toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127:331–41.
85. Kawai K, Shimura H, Minagawa M, Ito A, Tomiyama K, Ito M. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 2002;30:185–94.
86. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012.
87. Fuller MT, Spradling AC. Male and female *Drosophila* germline stem cells: Two versions of immortality. *Science.* 2007;316:402–4.
88. Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nature Cell Biol.* 2004;6:699–706.
89. LaPres JJ, Hudson LG. Identification of a functional determinant of differentiation-dependent expression in the involucrin gene. *J. Biol. Chem.* 1996;271:23154–60.
90. Banks EB, Crish JF, Welter JF, Eckert RL. Characterization of human involucrin promoter distal regulatory region transcriptional activator elements - A role for Sp1 and AP1 binding sites. *Biochem. J.* 1998;331:61–8.
91. Crish JF, Bone F, Banks EB, Eckert RL. The human involucrin gene contains spatially distinct regulatory elements that regulate expression during early versus late epidermal differentiation. *Oncogene.* 2002;21:738–47.
92. Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM. Epithelial barrier function: Assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays.* 2002;24:789–800.
93. Steinert PM, Marekov LN. Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 1997;272:2021–30.
94. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 2007;445:834–42.
95. Steven AC, Bisher ME, Roop DR, Steinert PM. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin-two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J. Struct. Biol.* 1990;104:150–62.
96. Brattsand M, Egelrud T. Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J. Biol. Chem.* 1999;274:30033–40.
97. Hansson L, Strömqvist M, Bäckman A, Wallbrandt P, Carlsteint A, Egelrud T. Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme: A skin-specific human serine proteinase. *J. Biol. Chem.* 1994;269:19420–6.
98. Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T. In human epidermis, β -defensin 2 is packaged in lamellar bodies. *Exp. Mol. Pathol.* 2003;74:180–2.
99. Hohl D, Mehrel T, Lichti U, Turner ML, Roop DR, Steinert PM. Characterization of human loricrin - Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J. Biol. Chem.* 1991;266:6626–36.

100. Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J. Cell. Sci.* 2001;114:3069–70.
101. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6:328–40.
102. López O, Cócera M, Wertz PW, López-Iglesias C, La Maza A de. New arrangement of proteins and lipids in the stratum corneum cornified envelope. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2007;1768:521–9.
103. Jang S-I, Steinert PM. Loricrin expression in cultured human keratinocytes is controlled by a complex interplay between transcription factors of the Sp1, CREB, AP1, and AP2 families. *J. Biol. Chem.* 2002;277:42268–79.
104. DiSepio D, Bickenbach JR, Longley MA, Bundman DS, Rothnagel JA, Roop DR. Characterization of loricrin regulation in vitro and in transgenic mice. *Differentiation.* 1999;64:225–35.
105. Al-Amoudi A, Dubochet J, Norlén L. Nanostructure of the epidermal extracellular space as observed by cryo-electron microscopy of vitreous sections of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 2005;124:764–77.
106. Koch PJ, Franke WW. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994;6:682–7.
107. Rothnagel JA, Steinert PM. The structure of the gene for mouse filaggrin and a comparison of the repeating units. *J. Biol. Chem.* 1990;265:1862–5.
108. Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, Nirunsuksiri W, Dale BA. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene: Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J. Biol. Chem.* 1992;267:23772–81.
109. Zhang D, Karunaratne S, Kessler M, Mahony D, Rothnagel JA. Characterization of mouse profilaggrin: Evidence for nuclear engulfment and translocation of the profilaggrin B-domain during epidermal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 2002;119:905–12.
110. Steinert PM, Marekov LN. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 1995;270:17702–11.
111. Makino T, Mizawa M, Yamakoshi T, Takaishi M, Shimizu T. Expression of filaggrin-2 protein in the epidermis of human skin diseases: A comparative analysis with filaggrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;449:100–6.
112. Pearton DJ, Dale BA, Presland RB. Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: Identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J. Invest. Dermatol.* 2002;119:661–9.
113. Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Taylor S, Ogg GS. Interleukin-22 downregulates filaggrin expression and affects expression of profilaggrin processing enzymes. *Br. J. Dermatol.* 2011;165:492–8.
114. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;124:R7-R12.

115. List K, Szabo R, Wertz PW, Segre J, Haudenschild CC, Kim S-Y, Bugge TH. Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *J. Cell Biol.* 2003;163:901–10.
116. Pearnton DJ, Nirunsuksiri W, Rehemtulla A, Lewis SP, Presland RB, Dale BA. Proprotein convertase expression and localization in epidermis: Evidence for multiple roles and substrates. *Exp. Dermatol.* 2001;10:193–203.
117. Yuki T, Komiya A, Kusaka A, Kuze T, Sugiyama Y, Inoue S. Impaired tight junctions obstruct stratum corneum formation by altering polar lipid and profilaggrin processing. *J. Dermatol. Sci.* 2013;69:148–58.
118. Steven AC, Steinert PM. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J. Cell. Sci.* 1994;107:693–700.
119. Jarnik M, Simon MN, Steven AC. Cornified cell envelope assembly: A model based on electron microscopic determinations of thickness and projected density. *J. Cell. Sci.* 1998;111:1051–60.
120. Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J. Invest. Dermatol.* 1994;103:731–40.
121. Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Selvakumar TA, McPherson T, Taylor S, Ogg GS. IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp. Dermatol.* 2012;21:104–10.
122. Kim BE, Howell MD, Guttman E, Gilleaudeau PM, Cardinale IR, Boguniewicz M, et al. TNF- α downregulates filaggrin and loricrin through c-Jun N-terminal kinase: Role for TNF- α antagonists to improve skin barrier. *J. Invest. Dermatol.* 2011;131:1272–9.
123. Mendelsohn R, Flach CR, Moore DJ. Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging: *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2006;1758:923–33.
124. van Drongelen V, Alloul-Ramdhani M, Danso MO, Mieremet A, Mulder A, van Smeden J, et al. Knock-down of filaggrin does not affect lipid organization and composition in stratum corneum of reconstructed human skin equivalents. *Exp. Dermatol.* 2013;22:807–12.
125. Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M. The skin: An indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 2008;17:1063–72.
126. Koning HD de, van den Bogaard EH, Bergboer, J. G. M., Kamsteeg M, van Vlijmen-Willems IMJJ, Hitomi K, et al. Expression profile of cornified envelope structural proteins and keratinocyte differentiation-regulating proteins during skin barrier repair. *Br. J. Dermatol.* 2012;166:1245–54.
127. Marekov LN, Steinert PM. Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 1998;273:17763–70.
128. Wertz PW, Downing DT. Covalently bound ω -hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* 1987;917:108–11.
129. Elias PM. Structure and function of the stratum corneum extracellular matrix. *J. Invest. Dermatol.* 2012;132:2131–3.

130. Jans R, Atanasova G, Jadot M, Poumay Y. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J. Invest. Dermatol.* 2004;123:564–73.
131. Takahashi M, Tezuka T, Katunuma N. Phosphorylated cystatin a is a natural substrate of epidermal transglutaminase for formation of skin cornified envelope. *FEBS Lett.* 1992;308:79–82.
132. Gibbs S, Fijneman R, Wiegant J, van Kessel AG, van de Putte P, Backendorf C. Molecular Characterization and Evolution of the SPRR Family of Keratinocyte Differentiation Markers Encoding Small Proline-Rich Proteins. *Genomics.* 1993;16:630–7.
133. Moll R, Moll I. Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch.* 1998;432:487–504.
134. Jackson B, Tilli, C. M. L. J., Hardman MJ, Avilion AA, MacLeod MC, Ashcroft GS, Byrne C. Late cornified envelope family in differentiating epithelia - Response to calcium and ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* 2005;124:1062–70.
135. Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* 1999;31:5–19.
136. Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* 2002;21:3919–26.
137. Eckert RL, Crish JF, Robinson NA. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol. Rev.* 1997;77:397–424.
138. Eckert RL, Crish JF, Banks EB, Welter JF. The epidermis: Genes on - Genes off. *J. Invest. Dermatol.* 1997;109:501–9.
139. Mattiuzzo NR, Toulza E, Jonca N, Serre G, Guerrin M. A large-scale multi-technique approach identifies forty-nine new players of keratinocyte terminal differentiation in human epidermis. *Exp. Dermatol.* 2011;20:113–8.
140. Potter IY de, Poumay Y, Squillace KA, Pittelkow MR. Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Exp. Cell Res.* 2001;271:315–28.
141. Stoll SW, Kansra S, Peshick S, Fry DW, Leopold WR, Wiesen JF, et al. Differential utilization and localization of ErbB receptor tyrosine kinases in skin compared to normal and malignant keratinocytes. *Neoplasia.* 2001;3:339–50.
142. Jost M, Kari C, Rodeck U. The EGF receptor - An essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur. J. Dermatol.* 2000;10:505–10.
143. Piepkorn M, Pittelkow MR, Cook PW. Autocrine regulation of keratinocytes: The emerging role of heparin- binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J. Invest. Dermatol.* 1998;111:715–21.
144. Jonak C, Mildner M, Klosner G, Paulitschke V, Kunstfeld R, Pehamberger H, et al. The hsp27kD heat shock protein and p38-MAPK signaling are required for regular epidermal differentiation. *J. Dermatol. Sci.* 2011;61:32–7.
145. Dlugosz AA, Yuspa SH. Coordinate changes in gene expression which Mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell Biol.* 1993;120:217–25.

146. Kobiela A, Fuchs E. Links between α -catenin, NF- κ B, and squamous cell carcinoma in skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103:2322–7.
147. Estrach S, Cordes R, Hozumi K, Gossler A, Watt FM. Role of the notch ligand delta1 in embryonic and adult mouse epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 2007.
148. Wang X, Bolotin D, Chu DH, Polak L, Williams T, Fuchs E. AP-2 α : A regulator of EGF receptor signaling and proliferation in skin epidermis. *J. Cell Biol.* 2006;172:409–21.
149. Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K, Karin M. IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature.* 2001;410:710–4.
150. Gareus R, Huth M, Breiden B, Nenci A, Rösch N, Haase I, et al. Normal epidermal differentiation but impaired skin-barrier formation upon keratinocyte-restricted IKK1 ablation. *Nature Cell Biol.* 2007;9:461–9.
151. Laurikkala J, Mikkola ML, James M, Tummers M, Mills AA, Thesleff I. p63 regulates multiple signalling pathways required for ectodermal organogenesis and differentiation. *Development (Cambridge).* 2006;133:1553–63.
152. Pastore S, Mascia F, Girolomoni G. The contribution of keratinocytes to the pathogenesis of atopic dermatitis. *Eur. J. Dermatol.* 2006;16:125–31.
153. Werfel T. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 2009;129:1878–91.
154. Leung, D. Y. M. New insights into atopic dermatitis: Role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol. Int.* 2013;62:151–61.
155. Marenholz I, Nickel R, Rüschenhoff F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, et al. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;118:866–71.
156. Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, et al. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;118:214–9.
157. Palmer, C. N. A., Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* 2006;38:441–6.
158. Beck LA, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin J, Gallo R, et al. Phenotype of atopic dermatitis subjects with a history of eczema herpeticum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;124:260-269.e7.
159. Boguniewicz M, Leung, D. Y. M. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125:4–13.
160. Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 2010;58:1–7.
161. Boguniewicz M, Leung, D. Y. M. 10. Atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;117:S475-S480+S489.
162. Kasraie S, Niebuhr M, Baumert K, Werfel T. Functional effects of interleukin 31 in human primary keratinocytes. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;66:845–52.
163. Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, et al. IL-31: A new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;117:411–7.

164. Nagy Laszlo Bela. Phenotypes of bronchial asthma. *Orv. Hetil.* 2017;158:491–8.
165. Warner JO. A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of cetirizine in preventing the onset of asthma in children with atopic dermatitis: 18 months' treatment and 18 months' posttreatment follow-up. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001;108:929–37.
166. van den Oord RAHM, Sheikh A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Online).* 2009;339:86–8.
167. Brown SJ, Asai Y, Cordell HJ, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, et al. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;127:661–7.
168. Akdis M, Akdis CA, Weigl L, Disch R, Blaser K. Skin-Homing, CLA+ Memory T Cells Are Activated in Atopic Dermatitis and Regulate IgE by an IL-13-Dominated Cytokine Pattern: IgG4 Counter-Regulation by CLA- Memory T Cells. *J. Immunol.* 1997;159:4611–9.
169. Novak N, Kraft S, Bieber T. Unraveling the mission of FcεRI on antigen-presenting cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;111:38–44.
170. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the T H1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 2007;13:139–45.
171. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986;136:2348–57.
172. Reiner SL. Development in Motion: Helper T Cells at Work. *Cell.* 2007;129:33–6.
173. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - A brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* 2007;37:S116-S123.
174. Eberlein-Konig B, Schafer T, Huss-Marp J, Darsow U, Mohrenschlager M, Herbert O, et al. Skin surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children. *Acta Derm. -Venereol.* 2000;80:188–91.
175. Murata Y, Ogata J, Higaki Y, Kawashima M, Yada Y, Higuchi K, et al. Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: An etiologic factor for ceramide deficiency? *J. Invest. Dermatol.* 1996;106:1242–9.
176. Pilgram, G. S. K., Vissers, D. C. J., van der Meulen H, Pavel S, Lavrijsen, S. P. M., Bouwstra JA, Koerten HK. Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* 2001;117:710–7.
177. Kezic S, Kemperman, P. M. J. H., Koster ES, Jongh CM de, Thio HB, Campbell LE, et al. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 2008;128:2117–9.
178. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung, D. Y. M. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;118:178–89.
179. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;111:1185–99.

180. Steinhoff M, Steinhoff A, Homey B, Luger TA, Schneider SW. Role of vasculature in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;118:190–7.
181. Mihm Jr., M. C., Soter NA, Dvorak HF, Austen KF. The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* 1976;67:305–12.
182. Leung, D. Y. M., Bhan AK, Schneeberger EE, Geha RS. Characterization of the mononuclear cell infiltrate in atopic dermatitis using monoclonal antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1983;71:47–56.
183. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung, D. Y. M. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 1994;94:870–6.
184. Geha RS. Regulation of IgE synthesis in humans. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992;90:143–50.
185. Saito H, Hatake K, Dvorak AM, Leiferman KM, Donnenberg AD, Arai N, et al. Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988;85:2288–92.
186. Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium: Association with expression of VCAM-1. *J. Immunol.* 1992;148:1086–92.
187. Groves RW, Allen MH, Haskard DO, MacDonald DM. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 in acute and chronic eczema. *Immunological and Pharmacological Aspects of Atopic and Contact Eczema.* 1991:85–8.
188. O'Garra A. T-cell differentiation: Commitment factors for T helper cells. *Curr. Biol.* 2000;10:R492-R494.
189. Werfel T, Allam J-P, Biedermann T, Eyerich K, Gilles S, Guttman-Yassky E, et al. Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016;138:336–49.
190. Purwar R, Werfel T, Wittmann M. IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4⁺ CCR4⁺ T cells: Possible role in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 2006;126:1043–51.
191. Purwar R, Kraus M, Werfel T, Wittmann M. Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: A possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 2008;128:59–66.
192. Leung, D. Y. M. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;105:860–76.
193. Novak N, Bieber T, Leung, D. Y. M. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;112:S128-S139.
194. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3(+) T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9(+) Foxp3(-) effector T cells (vol 9, pg 1347, 2008). *Nat. Immunol.* 2009;10:551.
195. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:521–31.
196. Akdis M, Trautmann A, Klunker S, Daigle I, Küçüksezer UC, Deglmann W, et al. T helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory/effector Th1 cells. *FASEB J.* 2003;17:1026–35.

197. Austrup F, Vestweber D, Borges E, Löhning M, Bräuer R, Herz U, et al. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature*. 1997;385:81–3.
198. Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, et al. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 1991;174:1461–6.
199. Novak N, Valenta R, Bohle B, Laffer S, Haberstock J, Kraft S, Bieber T. FcεRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004;113:949–57.
200. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 2009;129:1892–908.
201. O'Regan GM, Irvine AD. The role of filaggrin in the atopic diathesis. *Clin. Exp. Allergy*. 2010;40:965–72.
202. Anderson DS. The acid-base balance of the skin. *Br. J. Dermatol.* 1951;63:283–96.
203. McPherson T, Sherman VJ, Aslam A, Crack L, Chan H, Lloyd-Lavery A, et al. Filaggrin null mutations associate with increased frequencies of allergen-specific CD4⁺ T-helper 2 cells in patients with atopic eczema. *Br. J. Dermatol.* 2010;163:544–9.
204. Beck LA, Leung, D. Y. M. Allergen sensitization through the skin induces systemic allergic responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000;106:S258-S263.
205. McPherson T, Aslam A, Crack L, Chan H, Jones L, Ogg G. Frequencies of circulating allergen-specific T cells temporally associate with longitudinal changes in severity of cutaneous atopic disease. *Clin. Exp. Dermatol.* 2010;35:786–8.
206. Pendaries V, Le Lamer M, Cau L, Hansmann B, Malaisse J, Kezic S, et al. In a three-dimensional reconstructed human epidermis filaggrin-2 is essential for proper cornification. *Cell Death Dis.* 2015.
207. Hüffmeier U, Traupe H, Oji V, Lascorz J, Ständer M, Lohmann J, et al. Loss-of-function variants of the filaggrin gene are not major susceptibility factors for psoriasis vulgaris or psoriatic arthritis in German patients. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127:1367–70.
208. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007;445:866–73.
209. Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: The immunogenetics of psoriasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:699–711.
210. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: Characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1985;13:450–6.
211. Roberson, E. D. O., Bowcock AM. Psoriasis genetics: Breaking the barrier. *Trends Genet.* 2010;26:415–23.
212. Bergboer, J. G. M., Zeeuwen, P. L. J. M., Schalkwijk J. Genetics of psoriasis: Evidence for epistatic interaction between skin barrier abnormalities and immune deviation. *J. Invest. Dermatol.* 2012;132:2320–31.
213. Bergboer, J. G. M., Tjabringa GS, Kamsteeg M, van Vlijmen-Willems IMJJ, Rodijk-Olthuis D, Jansen, P. A. M., et al. Psoriasis risk genes of the late cornified envelope-3 group

- are distinctly expressed compared with genes of other LCE groups. *Am. J. Pathol.* 2011;178:1470–7.
214. Coto E, Santos-Juanes J, Coto-Segura P, Alvarez V. New psoriasis susceptibility genes: Momentum for skin-barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.* 2011;131:1003–5.
 215. Zhang X-J, Huang W, Yang S, Sun L-D, Zhang F-Y, Zhu Q-X, et al. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nat. Genet.* 2009;41:205–10.
 216. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF- κ B pathways. *Nat. Genet.* 2009;41:199–204.
 217. Fan X, Yang S, Huang W, Wang Z-M, Sun L-D, Liang Y-H, et al. Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus PSORS1 supports HLA-C as the susceptibility gene in the Han Chinese population. *PLoS Genet.* 2008.
 218. Sagoo GS, Tazi-Ahnini R, Barker, J. W. N., Elder JT, Nair RP, Samuelsson L, et al. Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *J. Invest. Dermatol.* 2004;122:1401–5.
 219. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia, N. V. C., Jenisch S, et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2006;78:827–51.
 220. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M. Psoriasis and HLA-Cw6. *Br. J. Dermatol.* 1980;102:179–84.
 221. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A, Runarsdottir EH, Hauksson VB, Upmanyu R, et al. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br. J. Dermatol.* 2003;148:233–5.
 222. Griffiths, C. E. M., Christophers E, Barker, J. N. W. N., Chalmers, R. J. G., Chimenti S, Krueger GG, et al. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br. J. Dermatol.* 2007;156:258–62.
 223. Lebwohl M. Psoriasis. *Lancet.* 2003;361:1197–204.
 224. Christophers E, Henseler T. Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 1987;279:S48-S51.
 225. Gaspari AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2006;54:S67-S80.
 226. Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H, et al. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J. Invest. Dermatol.* 1994;102:145–9.
 227. Prens E, Hegmans J, Lien, R. C. A., Debets R, Troost R, van Joost T, Benner R. Increased expression of interleukin-4 receptors on psoriatic epidermal cells. *Am. J. Pathol.* 1996;148:1493–502.
 228. Oestreicher JL, Walters IB, Kikuchi T, Gilleaudeau P. Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. *Pharmacogenomics J.* 2001;1:272–87.

229. Zhou X, Krueger JG, Kao, M. -C J., Lee E, Du F, Menter A, et al. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol. Genomics*. 2003;13:69–78.
230. Reischl J, Schwenke S, Beekman JM, Mrowietz U, Stürzebecher S, Heubach JF. Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127:163–9.
231. Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Chiricozzi A, Nogales KE, Shemer A, Fuentes-Duculan J, et al. Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;124:1235-1244.e58.
232. 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.
233. Wang F, Lee E, Lowes MA, Haider AS, Fuentes-Duculan J, Abello MV, et al. Prominent production of IL-20 by CD68+/CD11c+ Myeloid-derived cells in psoriasis: Gene regulation and cellular effects. *J. Invest. Dermatol.* 2006;126:1590–9.
234. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*. 2004;21:241–54.
235. Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, et al. IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur. J. Immunol.* 2009;39:2779–88.
236. Nogales KE, Suárez-Fariñas M, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Chiricozzi A, Cardinale I, et al. Atopic dermatitis keratinocytes exhibit normal TH17 cytokine responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125:744-746.e2.
237. van Beelen AJ, Teunissen, M. B. M., Kapsenberg ML, Jong EC de. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2007;7:374–81.
238. Ghadially R, Reed JT, Elias PM. Stratum corneum structure and function correlates with phenotype in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 1996;107:558–64.
239. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Mechanisms of disease: Psoriasis. *New Engl. J. Med.* 2009;361:496-509+444.
240. Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Déglon N, Pralong W, Aebischer P. Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum. Gene Ther.* 2002;13:2197–201.
241. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. 2010;129:311–21.
242. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25:402–8.
243. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 2008;3:1101–8.
244. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95:14863–8.
245. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*: Springer-Verlag; 2014.
246. Lanoix D, St-Pierre J, Lacasse A-A, Viau M, Lafond J, Vaillancourt C. Stability of reference proteins in human placenta: General protein stains are the benchmark. *Placenta*. 2012;33:151–6.

247. Breton MD, Devore MD, Brown DE. A tool for systematically comparing the power of tests for normality. *J. Stat. Comput. Simul.* 2008;78:623–38.
248. Yap BW, Sim CH. Comparisons of various types of normality tests. *J. Stat. Comput. Simul.* 2011;81:2141–55.
249. Beigneux AP, Vergnes L, Qiao X, Quatela S, Davis R, Watkins SM, et al. Agpat6 - A novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium. *J. Lipid Res.* 2006;47:734–44.
250. Yan QC, Kuo M-S, Li S, Bui HH, Peake DA, Sanders PE, et al. AGPAT6 is a novel microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 2008;283:10048–57.
251. Shi HB, Zhao WS, Luo J, Yao DW, Sun YT, Li J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 and γ 2 isoforms alter lipogenic gene networks in goat mammary epithelial cells to different extents: *Journal of Dairy Science*. *Journal of Dairy Science* 2014.
252. Cheng W-C, Chang C-W, Chen C-R, Tsai M-L, Shu W-Y, Li C-Y, Hsu IC. Identification of reference genes across physiological states for qRT-PCR through microarray meta-analysis. *PLoS ONE* 2011.
253. Jonge HJM de, Fehrman, R. S. N., Bont ESJM de, Hofstra, R. M. W., Gerbens F, Kamps WA, et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS ONE* 2007.
254. Stawczyk-Macieja M, Szczerkowska-Dobosz A, Rebala K, Purzycka-Bohdan D. Genetic background of skin barrier dysfunction in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *Postep. Dermatol. Alergol.* 2015;32:123–6.
255. Son DN, Li L, Katsuyama H, Komatsu N, Saito M, Tanii H, Saijoh K. Abundant expression of Kallikrein 1 gene in human keratinocytes was mediated by GATA3. *Gene.* 2009;436:121–7.
256. Chen L, Lin Z, Liu Y, Cao S, Huang Y, Yang X, et al. DZ2002 alleviates psoriasis-like skin lesions via differentially regulating methylation of GATA3 and LCN2 promoters. *Int Immunopharmacol.* 2021;91:107334.
257. Sharma S, Sethi GS, Naura AS. Curcumin Ameliorates Ovalbumin-Induced Atopic Dermatitis and Blocks the Progression of Atopic March in Mice. *Inflammation.* 2020;43:358–69.
258. Choi DW, Jung SY, Shon D-H, Shin HS. Piperine Ameliorates Trimellitic Anhydride-Induced Atopic Dermatitis-Like Symptoms by Suppressing Th2-Mediated Immune Responses via Inhibition of STAT6 Phosphorylation. *Molecules* 2020.
259. Krug N, Hohlfeld JM, Kirsten AM, Kornmann O, Beeh KM, Kappeler D, et al. Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNase. *N. Engl. J. Med.* 2015;372:1987–95.
260. Sano S. Psoriasis as a barrier disease. *Dermatol. Sin.* 2015;33:64–9.
261. Bernard F-X, Pedretti N, Rosdy M, Deguercy A. Comparison of gene expression profiles in human keratinocyte mono-layer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; Transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis. *Exp. Dermatol.* 2002;11:59–74.

262. Seo M-D, Kang TJ, Lee CH, Lee A-Y, Noh M. HaCa T keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T helper cell cytokines. *Biomol. Ther.* 2012;20:171–6.
263. Zeitvogel J, Jokmin N, Rieker S, Klug I, Brandenberger C, Werfel T. GATA3 regulates FLG and FLG2 expression in human primary keratinocytes. *Sci. Rep.* 2017;7:11847.
264. Cookson, W. O. C. M., Moffatt MF. The genetics of atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2002;2:383–7.
265. van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature.* 2002;418:426–30.
266. Mirmohammadsadegh A, Tschakarjan E, Ljoljic A, Bohner K, Michel G, Ruzicka T, et al. Calgranulin C is overexpressed in lesional psoriasis [2]. *J. Invest. Dermatol.* 2000;114:1207–8.
267. Chapman SJ, Walsh A. Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* 1990;282:304–10.
268. Lundstrom A, Egelrud T. Evidence that cell shedding from plantar stratum corneum in vitro involves endogenous proteolysis of the desmosomal protein desmoglein I. *J. Invest. Dermatol.* 1990;94:216–20.
269. Vicanová J, Mieke Mommaas A, Mulder AA, Koerten HK, Ponc M. Impaired desquamation in the in vitro reconstructed human epidermis. *Cell Tissue Res.* 1996;286:115–22.
270. Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J. Invest. Dermatol.* 2004;122:1235–44.
271. Simon M, Jonca N, Guerrin M, Haftek M, Bernard D, Caubet C, et al. Refined Characterization of Corneodesmosin Proteolysis during Terminal Differentiation of Human Epidermis and Its Relationship to Desquamation. *J. Biol. Chem.* 2001;276:20292–9.
272. Komatsu N, Saijoh K, Sidiropoulos M, Tsai B, Levesque MA, Elliott MB, et al. Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: Dependence on age and gender. *J. Invest. Dermatol.* 2005;125:1182–9.
273. Feingold KR. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J. Lipid Res.* 2007;48:2531–46.
274. Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Colton SW, Abraham W, Strauss JS. Skin lipids: An update. *J. Invest. Dermatol.* 1987;88.
275. Wertz PW, van den Bergh B. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem. Phys. Lipids.* 1998;91:85–96.
276. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv. Lipid Res.* 1991;24:1–26.
277. Gudjonsson JE, Krueger G. A role for epigenetics in psoriasis: Methylated cytosine-guanine sites differentiate lesional from nonlesional skin and from normal skin. *J. Invest. Dermatol.* 2012;132:506–8.

278. Han EC, Cho SB, Ahn KJ, Oh SH, Kim J, Kim DS, et al. Expression of pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in Behçet's disease and its association with disease activity: A pilot study. *Ann. Dermatol.* 2011;23:313–20.
279. Motta S, Monti M, Sesana S, Mellesi L, Ghidoni R, Caputo R. Abnormality of Water Barrier Function in Psoriasis: Role of Ceramide Fractions. *Arch. Dermatol.* 1994;130:452–6.
280. Halawi A, Abbas O, Mahalingam M. S100 proteins and the skin: A review. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2014;28:405–14.
281. Petersson S, Shubbar E, Enerbäck L, Enerbäck C. Expression patterns of S100 proteins in melanocytes and melanocytic lesions. *Melanoma Res.* 2009;19:215–25.
282. Broome A-M, Ryan D, Eckert RL. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J. Histochem. Cytochem.* 2003;51:675–85.
283. David Farrar J, Ouyang W, Löhning M, Assenmacher M, Radbruch A, Kanagawa O, Murphy KM. An instructive component in T helper cell type 2 (Th2) development mediated by GATA-3. *J. Exp. Med.* 2001;193:643–9.
284. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 2008;9:1341–6.
285. Takeda H, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S-I, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature.* 1996;380:627–30.

V. Danksagungen

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Ich danke dem Leiter der Forschungsabteilung Herrn Prof. Dr. med. Thomas Werfel für die Bereitstellung des Themas, der Materialien sowie seiner langjährigen Erfahrung, von der die Betreuung dieser Arbeit profitieren durfte.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Jana Zeitvogel, die mir zu jedem Zeitpunkt innerhalb der letzten Jahre zur Seite stand, meine Fragen mit Geduld beantwortete und dabei sämtliche Aspekte dieser Arbeit mit mir beleuchtete. Für das Nahebringen des wissenschaftlichen Arbeitens danke ich auch den anderen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Ilona Klug, deren Unterweisungen zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden den größten Dank aussprechen. Unterstützung konnte ich von ihnen auf jedwede Art erfahren; gelegentlich vielleicht ohne, dass es ihnen bewusst wurde. Sowohl langjährige Freunde als auch solche, die dies hoffentlich werden mögen, begleiteten diese Arbeit und brachten sie so zu einem Abschluss.

Dieser Dank gilt jedoch auch ganz besonders meiner Mutter Kirsten Jokmin, die mir sowohl meine schulische Ausbildung als auch die universitäre Laufbahn ermöglichte. Ich danke für die Zusprache, das Vorbild zur Selbstständigkeit und das tiefe Vertrauen in mich, die letztendlich Kraft und Motivation in jeder Situation spenden und zum Besten antreiben. Somit verdanke ich ihr *per se* alles.

VII. Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „*Die Rolle des Transkriptionsfaktors GATA-3 in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere*“ in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Thomas Werfel mit der Unterstützung durch Dr. rer. nat. Jana Zeitvogel ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden.

Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: Scientific Reports 2017, GATA3 regulates FLG and FLG2 expression in human primary keratinocytes.

Ort, Datum

Unterschrift