

Abstracts

Seminar:
*„In-vitro Krankheitsmodelle der Haut-
Stand und Perspektiven“*



Gesellschaft für
Dermopharmazie

Vorsitzende:
Prof. Dr. Jens Baron, Aachen
Prof. Dr. Günther Weindl, Berlin

Seminar: In-vitro-Krankheitsmodelle der Haut – Stand und Perspektiven

3D-Hautmodelle für Untersuchungen der Hautbarriere und zur atopischen Dermatitis

*Prof. Dr. med. Jens Malte Baron,
Hautklinik der Medizinischen Fakultät der RWTH, Aachen*

Seit einigen Jahren werden dermatologische Experimente immer mehr in dreidimensionalen Hautäquivalenten durchgeführt, da Untersuchungen in menschlicher Haut aus ethischen Gründen strengen Auflagen unterliegen und die Haut von vielen Labortieren in ihren biologischen Eigenschaften insbesondere in der Wundheilung nicht der Situation in der menschlichen Haut entsprechen (unterschiedliche Dicke der Epidermis, Kontraktur der murinen Haut).

Dreidimensionale Hautmodelle verfügen im Gegensatz zu Einzelzellkulturen und Transwellexperimenten über eine intakte Hautbarriere, die funktionell weitgehend der In-vivo-Situation entspricht. Somit ist mit diesem System auch die Untersuchung der Wirkung von topisch applizierten Wirkstoffen auf Hautstrukturen möglich.

Kürzlich ist es uns gelungen, ein humanes „full thickness“ 3D-Hautmodell zu etablieren, in dem wir in funktionellen Untersuchungen unter anderem die Penetration von kleinmolekularen Substanzen, Irritantien und Allergenen sowie den transepidermalen Wasserverlust messen können. Durch die Applikation des Zytokins IL-31 kann in diesem die Morphologie der Epidermis und die Funktion der Hautbarriere des 3D- Modells so geändert werden, dass sie der läsionalen Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis ähnelt (J All Clin Immunol 129(2):426-433, 2012).

Um oberflächliche Barrierschädigungen der Haut im 3D-Hautäquivalent zu simulieren, können 3D-Modelle mittels Elektrokauter oder ultragepulsten Co2-Laser behandelt werden. Hierbei liefert nur der Co2-Laser eine standardisierte Läsion im Modell. Alternativ zum technisch aufwendigen 3D-Modell können auch - wie kürzlich beschrieben - Ex-vivo-Hautmodelle für die Untersuchung der Reparatur der Hautbarriere verwendet werden.



Seminar: In-vitro-Krankheitsmodelle der Haut – Stand und Perspektiven

Entwicklung eines 3D-Hautmodells für Psoriasis

Dipl.-Biol. Carolina Pfaff (1,2) unter Mitarbeit von Yvonne Marquardt (1), Katharina Czaja (1), Bernhard Lüscher (2) und Jens Malte Baron (1)

(1) Klinik für Dermatologie und Allergologie und

(2) Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Medizinische Fakultät der RWTH, Aachen

Psoriasis ist eine immunvermittelte entzündliche Hauterkrankung, die 2 - 3 % der weltweiten Bevölkerung betrifft. Die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung der Krankheit führen, sind aber noch nicht ausreichend aufgeklärt. Um die Forschung an diesem Thema weiter zu verbessern und eventuell neue Ansätze für die Behandlung von Psoriasis zu schaffen, haben wir ein dreidimensionales Psoriasis-Hautmodell entwickelt. Zum Aufbau dieses Hautäquivalents werden primäre Keratinozyten und Fibroblasten aus einer läsionalen Biopsie eines Psoriasis-patienten verwendet. Wir wollten im ersten Schritt Unterschiede dieses Psoriasismodells zu normalen 3D-Hautäquivalenten, für die Zellen von gesunden Probanden verwendet werden, untersuchen. Dazu wurden beide 3D-Modell-Arten für 48 Stunden und 5 Tage kultiviert und anschließend die Morphologie in einer H&E-Färbung verglichen. Schon nach 48 Stunden können deutliche Differenzierungsstörungen im Psoriasismodell im Vergleich zum Normalmodell erkannt werden. Diese fehlerhafte Differenzierung wird in Modellen, die 5 Tage kultiviert wurden, noch deutlicher. In der Epidermis von Psoriasismodellen sind dann sogar Strukturen, die Parakeratosen ähneln, zu erkennen. Zudem kann eine Heterogenität im gesamten Psoriasismodell festgestellt werden. Es wird angenommen, dass das proentzündliche Zytokin IL-17A eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Psoriasis spielt. Daher wollten wir den Einfluss von IL-17A auf die Hautbarriere in beiden Arten von 3D-Modellen bestimmen. Beide Modell-Arten zeigten bei 5-tägiger Behandlung mit IL-17A eine Heterogenität in der Dicke der Epidermis, wobei im Gesamten eine leichte Reduktion der Epidermis festgestellt wird. In Microarray-Analysen und immunhistologischen Färbungen konnte eine Herabregulierung von Genen und Proteinen, die für die Differenzierung der Epidermis und die Ausbildung der Hautbarriere wichtig sind, nach Behandlung mit IL-17A festgestellt werden. Dabei handelt es sich unter anderem um Filaggrin, Involucrin und Loricrin. Neben der Herabregulierung von Differenzierungsmarker-Proteinen konnte eine erhöhte Expression bei einer Reihe von antimikrobiellen Peptiden (AMPs), wie die der humanen beta-Defensine (hBDs) hBD-2 und hBD-3 sowie bei Mitgliedern der S100-Familie, wie S100A7, S100A7A und S100A12, bestimmt werden. Des Weiteren konnte nach IL-17A-Behandlung eine Heraufregulierung von allen Mitgliedern der IL-36 Zytokin-Familie festgestellt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unser neu etabliertes Psoriasismodell sich durch Differenzierungsstörungen von Normalmodellen unterscheidet und daher ein interessantes



Werkzeug für die weitere Forschung an dieser Krankheit darstellt. Aufgrund unserer ersten Ergebnisse kann man spekulieren, dass die Effekte von IL-17A auf die Hautbarriere zumindest zum Teil über die Induktion von IL-36 Zytokinen vermittelt werden und sie daher ein interessantes neues Target für die Behandlung von Psoriasis sein könnten.



Seminar: In-vitro-Krankheitsmodelle der Haut – Stand und Perspektiven

3D-Hautmodelle für angeborene Keratinisierungsstörungen

*Priv.-Doz. Dr. Hans-Christian Hennies,
Universität Innsbruck, Sektion Humangenetik, Innsbruck*

Erbliche Keratinisierungsstörungen sind eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von Hauterkrankungen. Sie sind gekennzeichnet durch Störungen in der terminalen Differenzierung der Keratinozyten. Klinische Kennzeichen umfassen eine ausgeprägte Keratose, lokalisierte oder generalisierte Schuppung der Haut und ein in der Regel mildes Erythem. Pathophysiologisch wird häufig eine schwere Störung der epidermalen Barrierefunktion beobachtet, die zu sekundären Merkmalen wie transepidermale Wasserverlust und Gedeihstörungen, aber auch Allergien und Ekzemen beitragen kann.

Im letzten Jahrzehnt führte besonders die methodische Entwicklung in der Genetik und Genomik zu umfangreichen neuen Erkenntnissen über die molekularen Ursachen genetisch bedingter, vor allem monogener Hautkrankheiten. Für das molekulare Verständnis der Krankheitsmechanismen fehlen aber geeignete Krankheitsmodelle, die auch benötigt werden, um die unzureichenden und in keinem Fall kausalen Therapieoptionen zu verbessern. Wir haben aus diesem Grund dreidimensionale Hautmodelle entwickelt, die zunächst primäre Keratinozyten und Fibroblasten enthalten und ein dermales und ein mehrschichtiges epidermales Äquivalent mit Basalmembranzzone und einer definierten Hornschicht bilden. Durch die Verwendung von Patientenzellen oder mit Einsatz genetischer Methoden haben wir mit diesen Ansätzen spezifische Modelle für verschiedene Keratinisierungsstörungen erstellt. Diese Modelle rekapitulieren wesentliche morphologische und pathophysiologische Merkmale dieser Genodermatosen, darunter die typische Störung der epidermalen Barrierefunktion.

Der Einsatz dieser Modelle für Untersuchungen im hohen Durchsatz, beispielsweise für die systematische Testung von Wirkstoffen oder toxikologische Analysen, ist durch die sehr begrenzte Lebensdauer primärer Keratinozyten eingeschränkt. In einer Weiterentwicklung dieser Methode werden daher induzierte pluripotente Stammzellen eingesetzt, um auch in großem Umfang individualisierte Krankheitsmodelle herzustellen.



Humanhautmodelle zur Charakterisierung immunologischer Prozesse – Chancen und Grenzen von Ersatzmethoden

*Prof. Dr. Günther Weindl,
Institut für Pharmazie,
Freie Universität, Berlin*

Künstliche Hautmodelle haben in den letzten Jahren für toxikologische Untersuchungen bereits eine breite Anwendung erfahren. Neben der Testung von Hautreizung, -korrosion und Phototoxizität spielen rekonstruierte Hautmodelle zunehmend eine Rolle bei der Untersuchung komplexer Endpunkte, wie Genotoxizität oder Sensibilisierung sowie in der dermatologischen Grundlagenforschung in Form von Krankheitsmodellen.

Die Entwicklung von Hautmodellen mit integrierten epidermalen dendritischen Zellen scheint in besonderem Maße richtungsweisend für die Prüfung des sensibilisierenden Potentials von Fremdstoffen aber auch für die Erforschung immunologisch bedingter Hauterkrankungen wie zum Beispiel Neurodermitis. Mehrere Ansätze für 3D-Hautmodelle wurden bereits erprobt und die prinzipielle Eignung zur Untersuchung molekularer Mechanismen der frühen immunologischen Antwort aufgezeigt. Allerdings stellt die stabile Integration von Immunzellen in rekonstruierte Haut eine besondere Herausforderung dar. So muss der Phänotyp und die Funktionalität der dendritischen Zellen in den In-vitro-Versuchssystemen erhalten bleiben, um die Mechanismen der Antigenaufnahme, Migration und Ausreifung zu analysieren.

Obgleich Ergebnisse dieser Modelle nicht ohne Weiteres auf die In-vivo-Situation übertragen werden können, reflektieren die komplexen Systeme immer besser die physiologischen beziehungsweise pathophysiologischen Vorgänge und sind deshalb eine geeignete Methode, immunologische Abläufe unter kontrollierten experimentellen Bedingungen nachzustellen. Ferner entfallen bei diesen Modellsystemen Speziesunterschiede bei gleichzeitiger Einsparung von Tierversuchen.

