

# **Die Rolle des Autoantigens CHD4 bei der Aufrechterhaltung des proinflammatorischen Teufelskreises in Dermatomyositis-Hautläsionen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Fatima Tugce Gül**

aus Aachen

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg Wenzel
2. Gutachter: PD Dr. MUDr. Valentin S. Schäfer

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.07.2024

Aus dem Zentrum für Hauterkrankungen des Universitätsklinikums Bonn  
Direktorinnen: Prof. Dr. med. Natalija Novak und Prof. Dr. med. Jennifer Landsberg

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	4
<b>1.</b>	<b>Deutsche Zusammenfassung</b>	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	10
1.3	Ergebnisse	13
1.4	Diskussion	21
1.5	Zusammenfassung	26
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	27
<b>2.</b>	<b>Veröffentlichung</b>	32
	Abstract	32
	Introduction	32
	Materials and Methods	33
	Results	34
	Discussion	38
	References	40
<b>3.</b>	<b>Danksagung</b>	42

## Abkürzungsverzeichnis

AAk	Autoantikörper
AD	Atopische Dermatitis
ANA	Antinukleäre Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CDLE	Chronisch diskoider Lupus erythematoses
CHD4	Chromodomäne-Helikase-DNA-bindendes Protein 4, Mi-2
CXCL9	CXC-Motif-Ligand 9
CXCL10	CXC-Motif-Ligand 10
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DM	Dermatomyositis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FC	Durchflusszelle
GO	Gen Ontologie
HaCaT	Immortalisierte humane Keratinozyten-Zelllinie
HC	gesunde Kontrollhaut
H&E	Hämatoxylin-Eosin
IFN	Interferon
K <sub>D</sub>	Dissoziations-Gleichgewichtskonstante
LE	Lupus erythematoses
Lipo	Lipofectamine

LP	Lichen planus
LSMean	Mittelwerte der kleinsten Quadrate
MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MxA	Interferon-induziertes GTP-bindendes Protein Mx1
NF- $\kappa$ B	Kernfaktor Kappa-Leichtkettenverstärker aktivierter B Zellen
NuRD	Nukleosomenumbau und Deacetylase
NXP2	Nukleares Matrix Protein-2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PL-7	Threonyl-tRNA-Synthetase
Pso	Psoriasis
RE	Reaktionseinheit
SAE	SUMO-Aktivierungsenzym
SCLE	Subakut kutaner Lupus erythematodes
SRP	Signalerkennungspartikel
SSA	Sjögren-Syndrom-Antigen A
SSB	Sjögren-Syndrom-Antigen B
TIF-1 $\gamma$	Transkription Intermediär Faktor 1 $\gamma$
t-SNE	t-verteilte stochastische Nachbareinbettung
UV	ultraviolett

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

### 1.1.1 Dermatomyositis allgemein

Dermatomyositis (DM) ist eine idiopathische entzündliche Myopathie, die zu den Kollagenosen zählt. Patienten mit DM weisen häufig antinukleäre Antikörper (ANA) auf, einschließlich der für die Dermatomyositis spezifischen Anti-Mi-2 Autoantikörper (AAk), die gegen das Chromodomänen-Helikase-DNA-bindende Protein 4 (CHD4) gerichtet sind. DM kann als juvenile Form etwa zwischen dem 5. und 12. Lebensjahr oder als adulte Form etwa zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr auftreten. Letztere ist mit dem Auftreten von Malignomen assoziiert (DeWane et al., 2020; Bogdanov et al., 2018; Swafford und Roach, 2020). Die Inzidenz von DM variiert je nach betrachteter Bevölkerungsgruppe zwischen zwei und neun Fällen pro einer Million Einwohnern (Bendewald et al., 2010; Dalakas, 2015; Jorizzo, 2002; Bologna, 2017).

Bei der DM kommt es gewöhnlich zu einer symmetrischen entzündlichen Myopathie der proximalen Extremitätenmuskulatur und zu charakteristischen Hauterscheinungen, die als pathognomonisch für die DM gelten. Dazu gehören fliederfarbene Erytheme der oberen Augenlider (heliotropes Erythem) sowie erythematöse violette flache Papeln und Plaques an den Dorsalseiten der Metakarpophalangeal- und Interphalangealgelenke, sogenannte Gottron-Papeln (Bologna, 2017; DeWane et al., 2020). Daneben sind auch extrakutane Manifestationen wie eine Lungenbeteiligung wichtige prognostische Faktoren für die Morbidität und Mortalität der DM (Cobos et al., 2020). Histopathologisch zeigen sich in Hautbiopsien von DM-Patienten eine epidermale Atrophie und Anzeichen einer Interface-Dermatitis mit vakuoliger Degeneration der basalen Keratinozyten (Hornung und Wenzel, 2014; Bologna, 2017).

### 1.1.2 Autoantikörper in Dermatomyositis

Die Prävalenz von AAk bei DM-Patienten beträgt 34,4 % für myositis-spezifische AAk und 41,4 % für myositis-assoziierte AAk (Cruellas et al., 2013). Die häufigsten DM-spezifischen AAk sind Anti-Mi-2, Anti-MDA5, Anti-SAE, Anti-NXP-2, Anti-SRP, Anti-TIF-

1y oder Anti-Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wie Anti-Jo1 und Anti-PL-7 (Burbelo et al., 2016; Bologna, 2017). DM-assoziierte Antikörper wie Anti-Ro/SSA treten ebenfalls häufig bei anderen Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses (LE) auf (Hornung und Wenzel, 2014). AAK in Kollagenosen sind größtenteils antinukleäre Antikörper (ANA), die sich gegen zelluläre Strukturen grundlegender Bedeutung für die Zellfunktion richten. Diese ANAs sind nicht nur relevant für die Diagnosestellung, sondern auch hilfreich, um den klinischen Phänotyp oder prognostische Faktoren wie den Therapieerfolg vorherzusagen (Gono und Kuwana, 2020). Darüber hinaus korrelieren Serumspiegel myositis-spezifischer AAK mit der Krankheitsaktivität, wobei bei 30 % der DM-Patienten mit Anti-Mi-2 AAK sich diese sogar normalisieren, wenn die Krankheit weniger aktiv wird (Thompson et al., 2018; Pinal-Fernandez et al., 2019).

### 1.1.3 Anti-Mi-2 Autoantikörper als serologischer Marker für Dermatomyositis

Anti-Mi-2 AAK weisen eine diagnostische Sensitivität von etwa 4-18 % und eine Spezifität von 98 %-100 % auf (Ghirardello et al., 2013). Die Prävalenz von Anti-Mi-2 AAK variiert je nach Ethnizität und geografischer Lage zwischen 4 % und 60 % (DeWane et al., 2020; Okada et al., 2003; Mammen, 2010). Kutane Manifestationen, die mit Anti-Mi-2 DM assoziiert sind, umfassen eine Gesichts- und Nackenbeteiligung, letzteres ist auch bekannt als Shawl-Zeichen. Typisch sind ebenso eine Poikilodermie und Gottron-Papeln (DeWane et al., 2020; Cruellas et al., 2013; Bologna, 2017). Darüber hinaus weisen Patienten mit Anti-Mi-2 AAK häufig eine charakteristische Muskelbeteiligung mit außergewöhnlich hohen CK-Werten auf (Cruellas et al., 2013; Bologna, 2017; DeWane et al., 2020; Liang et al., 2020; Tanboon et al., 2021). Hingegen treten schwerwiegendere kutane Merkmale wie Kalzinose, ulzerative Vaskulopathie oder systemische Manifestationen wie eine interstitielle Lungenerkrankung bei dieser klinischen Untergruppe seltener auf (DeWane et al., 2020; Stuhlmüller et al., 2019). Die Assoziation zwischen Anti-Mi-2 AAK und einem erhöhten Malignomrisiko bei DM ist nach wie vor umstritten, da Studien zu gegensätzlichen Ergebnissen kommen (Marzęcka et al., 2022).

Anti-Mi-2 AAK erkennen das CHD4-Protein, einen Teil des Nukleosomenumbau- und Deacetylase (NuRD)-Komplexes, eines Proteinkomplexes mit mehreren Untereinheiten, der an der Regulierung der Transkription auf chromosomaler Ebene beteiligt ist und als

wichtiger transkriptioneller Korepressor fungiert (Suber et al., 2008). CHD4 spielt eine Reihe von Schlüsselrollen, einschließlich der Regulation der Homöostase der Epidermis (Kashiwagi et al., 2017). Die Haut muss schnell auf Umweltreize reagieren, was eine sofortige Aktivierung von Signal- und Transkriptionsprogrammen erfordert. CHD4 reguliert diese Stressreaktionen der Haut, indem es den Zugang zum Chromatin an Enhancern beschränkt, die mit Genen der Stressreaktion in Verbindung stehen (Shibata et al., 2020; Kashiwagi et al., 2017).

#### 1.1.4 Pathogenese der Dermatomyositis

Die Pathogenese der DM ist multifaktoriell, komplex und noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass genetische, umweltbedingte und immunologische Mechanismen, einschließlich AAK, eine Rolle spielen (DeWane et al., 2020). Einerseits spielt eine fehlerhafte Komplementaktivierung eine Rolle, wobei diskutiert wird, ob dies auf dem klassischen Weg geschieht oder AAK-abhängig ist (DeWane et al., 2020). Andererseits ist das zentrale Merkmal der DM-Pathogenese die hohe Expression von Interferonen (IFN) und IFN regulierten Proteinen durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems, begleitet von einer sekundären Dysregulation der adaptiven Immunantwort (Hornung und Wenzel, 2014). Die entzündete Haut in DM zeigt eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Genen, die durch Typ-I IFN reguliert werden, einschließlich des Mx1-Proteins und der Chemokine CXCL9 und CXCL10 (Hornung und Wenzel, 2014). Auf zellulärer Ebene spielen hierbei CD4+ T Zellen, B Zellen und dendritische Zellen eine Rolle (Kao et al., 2011). Die Immunantwort scheint durch Umweltfaktoren wie UV-Exposition, Medikamente und Infektionen bei genetisch veranlagten Personen ausgelöst zu werden (DeWane et al., 2020). Eine besondere Rolle spielt hierbei die UV-Strahlung als allgemein anerkannter Umweltfaktor, der für die Exazerbation der DM verantwortlich ist (Love et al., 2009; Artuković et al., 2010).

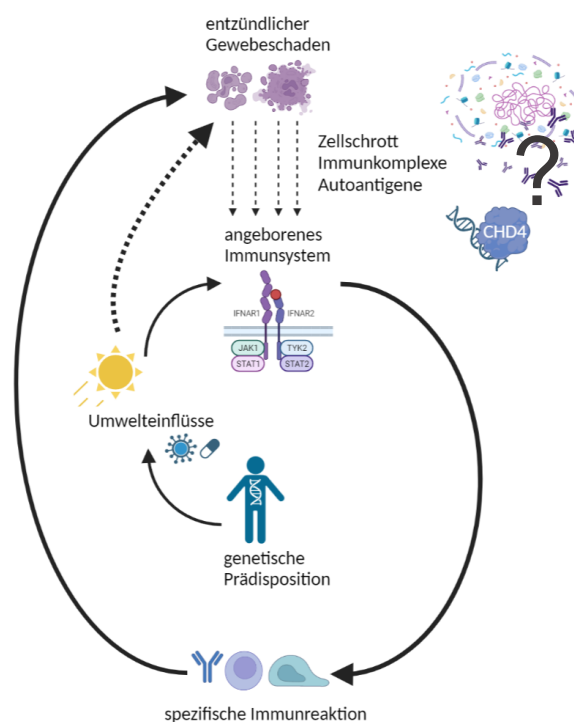
#### 1.1.5 Fragestellung dieser Forschungsarbeit

In Anbetracht der Informationen, die wir über die Pathogenese der DM haben, wird die Immunantwort höchstwahrscheinlich durch Myositis-spezifische Antigene ausgelöst. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die Expression von CHD4 in UV-bestrahlten



Keratinocyten die Autoimmunität und in der Folge den DM-Phänotyp beeinflussen könnte (Betteridge et al., 2009). Diese These wird durch die Assoziation von Myositis-Autoantigenen mit Nukleinsäuren gestärkt, da dies die Typ-I IFN Sekretion und somit die Verfügbarkeit der Antigene sowie Ausbreitung der Immunantwort verstärken könnte (Thompson et al., 2018). Die Expression des Autoantigens Mi-2 ist in Muskelbiopsien von DM-Patienten, nicht aber von Polymyositis-Patienten, um etwa das 10-fache erhöht (Casciola-Rosen et al., 2005). Jedoch weisen nur ein Drittel der DM-Patienten mit Mi-2 Antigen in den Muskelbiopsien auch Anti-Mi-2 AAK auf (Fornaro et al., 2021). Aus diesem Grund könnte ein DM-spezifisches Expressionsmuster der Autoantigene möglicherweise die Autoimmunantwort regulieren, die mit dem jeweiligen Phänotyp einhergeht (Suber et al., 2008; Casciola-Rosen et al., 2005).

In dieser Forschungsarbeit soll dies anhand des DM Autoantigens CHD4 untersucht werden. Inwiefern kann das Autoantigen CHD4 die Spirale der Autoimmunität und somit die Typ-I IFN gesteuerte Immunantwort in DM beeinflussen, insbesondere unter Bedingungen von zellulärem Stress wie UV-Strahlung?



**Abb. 1:** Die „Spirale der Autoimmunität“ ist das aktuelle Modell der Ätiopathogenese der Dermatomyositis. In diesem proinflammatorischen Teufelskreis wird dargestellt wie umweltbedingte Auslöser bei genetisch prädisponierten Patienten zu einer überschießenden Immunantwort führen können. Abbildung modifiziert mit BioRender.com nach der Originalpublikation (Hornung und Wenzel, 2014).

## 1.2 Material und Methoden

### 1.2.1 Patienten und Hautbiopsien

Stanzbiopsien von erkrankter Haut wurden von Patienten mit aktiver und unbehandelter Dermatomyositis (DM), chronisch diskoidem Lupus erythematoses (CDLE), Lichen planus (LP), Psoriasis (Pso), atopischer Dermatitis (AD) sowie aus gesunder Kontrollhaut (HC) entnommen, alle mit  $n = 5$ . Die Kontrollproben (HC) aus gesunder Haut wurden von fünf Patienten gewonnen, die sich einem plastisch-rekonstruktiven Eingriff unterzogen hatten. Alle Patienten haben ihr Einverständnis gegeben und die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission in Bonn, Deutschland, genehmigt (Nr. 09004), und sie erfüllt auch die Grundsätze der Deklaration von Helsinki.

### 1.2.2 Histologie und Immunhistologie

Alle Schnitte wurden aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Hautbiopsieproben hergestellt. Es wurden H&E-Färbungen und Periodsäure-Schiff-Reaktion-Färbungen durchgeführt. Für die Immunhistologie wurde der Anti-CHD4 Antikörper (ABIN560357, Antikörper-online) und das REAL-Färbung Kit (Dako, Glostrup) mit Fast Red als Chromogen verwendet. Eine semiquantitative Skala wurde genutzt, um die Proteinexpression von 0 bis 3 zu bewerten (0 = keine Expression; 1 = schwache Expression; 2 = mittlere Expression und 3 = starke Expression) (Wenzel et al., 2005).

### 1.2.3 Stimulation der Zellkultur und Messung von Zytokinen

Spontan immortalisierte menschliche Keratinozyten (HaCaT) wurden mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, welches 4500 mg/L D-Glucose und L-Glutamin, ohne Natrium Pyruvat, ergänzt mit 100 U/mL Penicillin-Streptomycin und 10 % fötales Kälberserum enthält.  $1,0 \times 10^5$  HaCaT-Zellen wurden mit CHD4/Mi2-Protein (2,4  $\mu\text{g/mL}$ ) von ProSpec (Revohot, Israel) und DNA (12,5  $\mu\text{g/mL}$ ), isoliert aus HaCaT-Zellen mit dem NucleoSpin® Tissue Aufreinigungskit (Macherey-Nagel, Dueren), stimuliert. Lipofectamine 2000 (15  $\mu\text{g/mL}$ ) von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, diente als Transfektionsreagenz. Das CXCL10-Protein wurde in den Überständen der Zellen 24 Stunden nach der Stimulation gemessen.

#### 1.2.4 Immunfluoreszenz

$0,2 \times 10^5$  HaCaT-Zellen/cm<sup>2</sup> wurden auf einem Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide-System (#177402, Thermo Fisher Scientific), das zuvor mit dem Coating Matrix Kit (R-011- K, Thermo Fisher Scientific) beschichtet wurde, angehaftet. Die Zellen wurden entweder nicht behandelt, mit 150 mJ/cm<sup>2</sup> UV-bestrahlt mit einer Ultramed 400 W Breitband UV-Lampe oder gemäß dem Zellstimulationsprotokoll transfiziert und für 4 Stunden in serumfreiem DMEM-Nährmedium inkubiert. Die Zellen wurden in 4 % Paraformaldehyd fixiert, in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, bei 90 °C in pH 9 Target Retrieval Solution gekocht, mit 0,1 % Triton permeabilisiert und anschließend mit 5 % BSA blockiert. Bei den verwendeten Primärantikörpern handelt es sich um Anti-DNA Antikörper (AC-30-10, Chemicon International, Temecula) und Anti-CHD4/Mi2 Antikörper (ABIN560357 antibodies-online, Aachen). Der verwendete Sekundärantikörper für den DNA-Antikörper ist Anti-Maus eFluor® 660 (50-5790, Affymetrix, Santa Clara) und für den CHD4-Antikörper Anti-Maus Alexa Fluor® 488 (ab150113, abcam, Cambridge). Für die Befestigung wurde Fluoromount-G™ genutzt. Die Bilder wurden mit dem Axio Observer.Z1 aufgenommen, der mit einem ApoTome2 und einer Colibri2 LED Lichtquelle (alle von Carl Zeiss, Oberkochen) ausgestattet ist. Die Anregungswellenlängen betragen 353 nm (DAPI), 493 nm (Alexa Fluor® 488) und 653 nm (eFluor® 660). Eine semiquantitative Skala wurde verwendet, um das Vorhandensein eines Fluoreszenzsignals im untersuchten Bereich von 0 bis +++ zu bewerten (0 = keine Expression; (+) = sehr schwache Präsenz nur in einzelnen Zellen; + = schwache Präsenz; ++ = mittlere Präsenz; +++ = starke Präsenz).

#### 1.2.5 Bestimmung der Bindungsaffinität mittels Oberflächenplasmonenresonanz

Die Experimente wurden bei 37 °C mit einem Biacore™ 3000 (GE Healthcare) und mit hochaffinen linear Polycarboxylate basierten Biosensorchips (NiHC200M, XanTec, Düsseldorf) durchgeführt. Alle Puffer stammen aus dem Pufferkit für NiHC-Sensorchips (KNiH-50, XanTec, Düsseldorf). Durchflusszelle 1 (FC1) wurde als Referenz-Durchflusszelle verwendet, die nicht modifiziert wurde. Die Durchflusszelle 2 (FC2) wurde für die Immobilisierung des Proteins verwendet. Für die abschließende Messung wurden beide Durchflusszellen mit 5-minütigen Injektionen von Immobilisierungspuffer (bei 8

$\mu\text{L}/\text{min}$ ) konditioniert und 2 Minuten mit Laufpuffer (bei  $8 \mu\text{L}/\text{min}$ ) gewaschen. Zu FC2 wurde dann der  $\text{NiCl}_2$ -Lade Puffer 6 Minuten lang injiziert (bei  $8 \mu\text{L}/\text{min}$ ), was zu einem Anstieg der Basislinie über 300 Reaktionseinheiten (RE) geführt hat. Anschließend wurde erneut für 2 Minuten gewaschen. Das Protein wurde dann über einen Zeitraum von 4 min (bei  $8 \mu\text{L}/\text{min}$ ) injiziert. Ungebundenes Protein wurde mit Laufpuffer abgewaschen, um die Basislinie zu stabilisieren. Der Protein-DNA Bindungssassay wurde bei einer Laufpuffer-Flussrate von  $20 \mu\text{L}/\text{min}$  durchgeführt. DNA-Lösungen in Konzentration 0,1 bis 500 nM wurden für 2 Minuten injiziert. Der Sensorchip wurde durch Injektion von EDTA-Regenerationspuffer für 4 Minuten ( $20 \mu\text{L}/\text{min}$ ) und anschließend NaOH-Elutionspuffer für 3 Minuten ( $20 \mu\text{L}/\text{min}$ ) regeneriert, um jegliches gebundene Material zu entfernen. Die Bindung an das Substrat wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung FC1 von FC2 nachgewiesen.

#### 1.2.6 Genexpressionsversuch

HaCaT-Zellen wurden entweder mit  $12,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  DNA, isoliert aus HaCaT-Zellen mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue Purification Kit (Macherey-Nagel, Dueren), mit  $1,2 \mu\text{g}/\text{mL}$  CHD4 von ProSpec (Revohot) oder mit DNA ( $12,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) + CHD4 ( $1,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) stimuliert. Alle Proben wurden mit  $15 \mu\text{g}/\text{mL}$  Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific) transfiziert. Die RNA wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> RNA mini isolation Kit (Macherey-Nagel, REF 740955, Düren) gemäß der Benutzeranweisung isoliert. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Thermo Scientific<sup>TM</sup> NanoDrop<sup>TM</sup> 2000/2000c Spektrophotometer gemessen. Anschließend wurde die RNA von der Next Generation Core Facility des Universitätsklinikums Bonn mittels dem QuantSeq 3'-mRNA Library Prep Kit (Lexogen) vorbereitet und mit dem Illumina HiSeq<sup>®</sup> 2500 Sequencing System sequenziert (Standard 3'RNA seq mit 50 Zyklen). Für die Analyse wurde die Partek-Software mit den Standardbedingungen verwendet. STAR wurde verwendet und an Homo sapiens (Mensch)-hg19\_ chr22 (ganzes Genom) ausgerichtet.

#### 1.2.7 Statistik

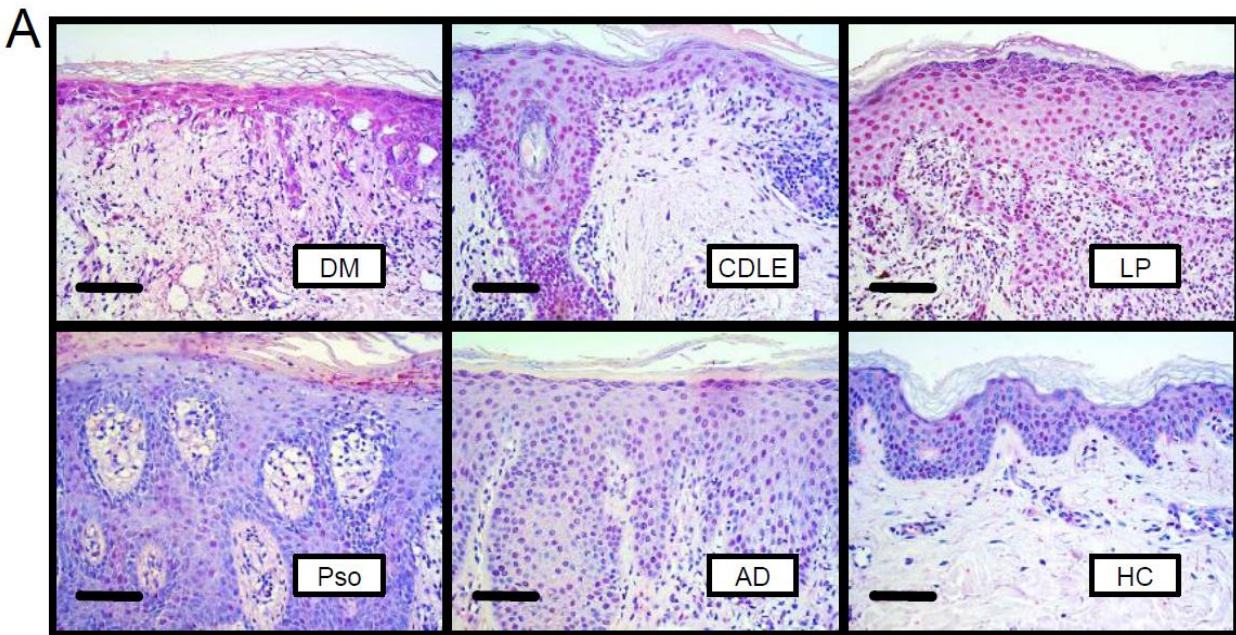
Für alle statistischen Analysen der in vitro-Experimente wurde GraphPad Prism 5 verwendet. Hierbei wurde für alle Analysen der Mann-Whitney U-Test angewandt. Für die

Statistik der Bewertung der Färbungsintensität von CHD4 in Kollagenosen wurde ein einseitiger Mann-Whitney U-Test verwendet, mit der Hypothese, dass die CHD4-Expression in Typ-I IFN gesteuerten Autoimmundermatosen höher ist. Für die Expression von CXCL10 in stimulierten HaCaT-Zellen wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney U-Test verwendet. Die p-Werte von  $< 0,05$  galten als signifikant (\*), p-Werte  $< 0,01$  als hoch signifikant (\*\*) und (\*), p-Werte von  $< 0,001$  als höchst signifikant (\*\*\*).

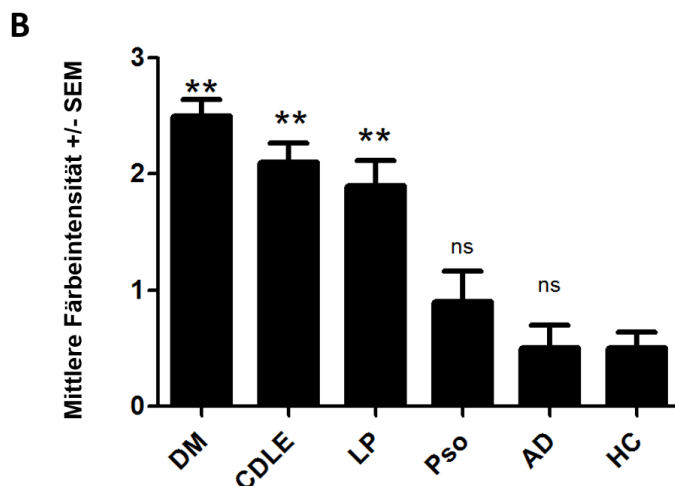
## 1.3 Ergebnisse

### 1.3.1 CHD4 ist in Typ-I IFN gesteuerten Autoimmundermatosen DM, CDLE und LP signifikant hochreguliert

Das CHD4 Protein wurde in Hautbiopsien von Patienten mit fünf verschiedenen dermatologischen Erkrankungen angefärbt (Abbildung 2). Die Gruppe umfasst die drei Typ-I IFN regulierten, kutanen Autoimmunerkrankungen Dermatomyositis (DM), chronisch diskoider Lupus erythematodes (CDLE) und Lichen planus (LP) sowie zwei Krankheiten mit unterschiedlicher Ätiologie, Psoriasis (Pso) und atopische Dermatitis (AD). Die Hautbiopsien erkrankter Haut wurden mit gesunder Kontrollhaut (HC) verglichen. CHD4 ist bei DM, CDLE und LP im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht (Abbildung 3). Das Färbemuster deutet auf eine hohe Expression von CHD4 in der Epidermis hin. DM zeigt die höchste Färbungsintensität von CHD4 mit einem etwa fünffachen Anstieg im Vergleich zu der gesunden Kontrolle (Abbildung 3). Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der CHD4-Färbung zwischen AD, Pso und der gesunden Kontrollgruppe. Zusätzlich zu den nukleären Färbungsmustern ist auch eine starke zytoplasmatische Färbung bei DM und CDLE zu erkennen, sowie eine leichte zytoplasmatische Färbung bei LP (Abbildung 7, ergänzende Abbildung).



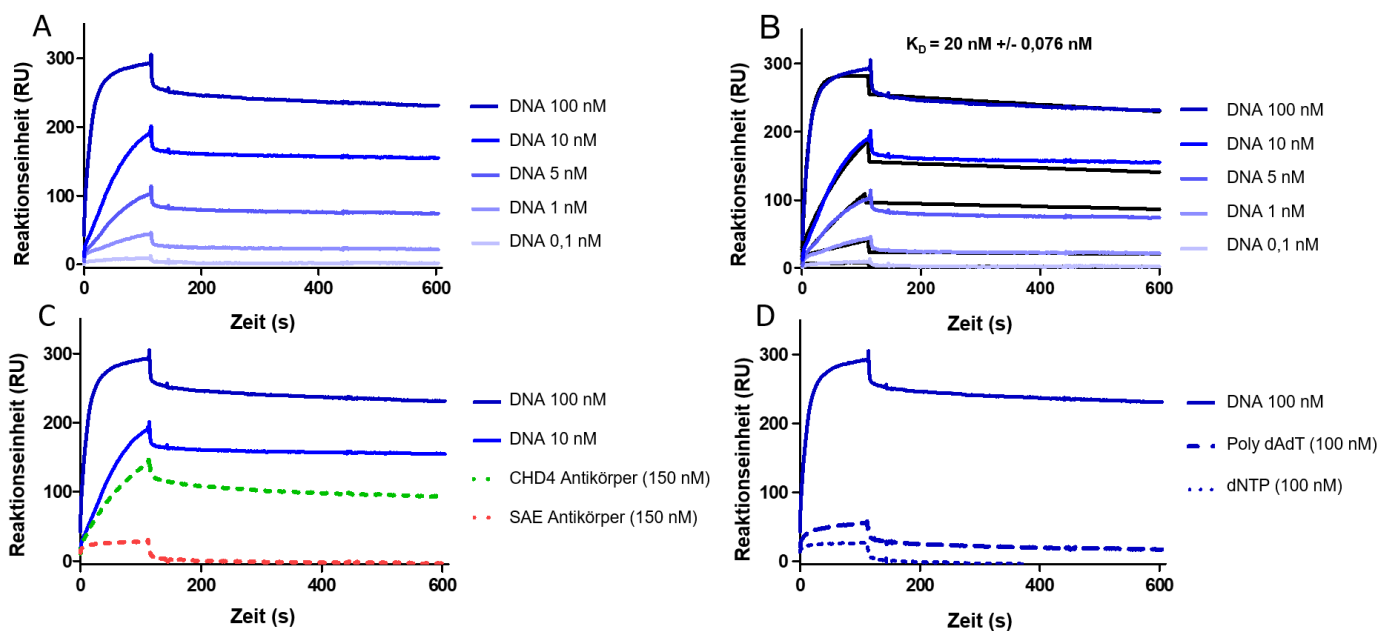
**Abb. 2:** Repräsentative immunhistologische mikroskopische Aufnahmen zeigen die Expression von CHD4 bei verschiedenen Hauterkrankungen: Dermatomyositis (DM), chronischer diskoider Lupus erythematoses (CDLE), Lichen planus (LP), Psoriasis (Pso), atopische Dermatitis (AD) und gesunde Kontrollhaut (HC) (n = 5 für jede Untergruppe). Vergrößerung:  $\times 200$ , Maßstabsbalken = 0,1 mm. Abbildung modifiziert nach der Originalpublikation (Guel et al., 2023).



**Abb. 3:** Die mittlere Färbeintensität von CHD4 wurde immunhistochemisch bei verschiedenen Hauterkrankungen: Dermatomyositis (DM), chronischer diskoider Lupus erythematoses (CDLE), Lichen planus (LP), Psoriasis (Pso), atopische Dermatitis (AD) und gesunder Kontrollhaut (HC) gemessen. Die Sternchen kennzeichnen das Signifikanzniveau im Vergleich zu HC. Die statistischen Analysen wurden mithilfe eines einseitigen Mann-Whitney U-Tests durchgeführt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ns = nicht signifikant). Abbildung modifiziert nach der Originalpublikation (Guel et al., 2023).

### 1.3.2 CHD4 bindet konzentrationsabhängig an DNA mit einer $K_D$ von $0,2 \text{ nM} \pm 0,076 \text{ nM}$

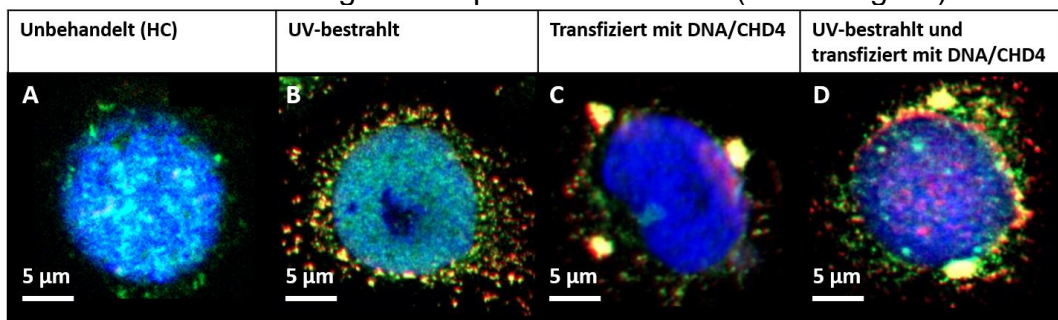
CHD4 bindet konzentrationsabhängig an DNA (Abbildung 4A, B). Die Affinitätsbestimmung für die konzentrationspezifische Bindung von DNA an das CHD4-Protein ergab eine Dissoziations-Gleichgewichtskonstante ( $K_D$ ) von  $0,2 \text{ nM} \pm 0,076 \text{ nM}$ . Die Bindung von DNA an CHD4 ist sehr stark, da praktisch keine Dissoziation beobachtet werden kann (Abbildung 4A). Wie erwartet zeigt der CHD4-spezifische Antikörper eine Bindung an CHD4, während der SAE-Antikörper keine spezifische Interaktion mit CHD4 zeigt (Abbildung 4C). Im Vergleich zur endogenen DNA zeigte Poly-dAdT bei gleicher Konzentration eine schwächere Interaktion mit CHD4 (Abbildung 4D). Es konnte keine Bindung von dNTPs bei 100 nM an CHD4 beobachtet werden (Abbildung 4D), was am ehesten auf die geringe Größe der nicht polymerisierten Nukleotide und die Massenabhängigkeit der Oberflächenplasmonenresonanz zurückzuführen ist.



**Abb. 4:** Sensogramm für die Bindung von CHD4 an endogene DNA, Poly-dAdT, dNTPs und CHD4/SAE-Antikörper. (A) Sensogramm für verschiedene DNA-Konzentrationen (0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM), die an CHD4 binden. (B) Die Berechnung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante ( $K_D$ ) mittels des Langmuir 1:1-Bindungsmodells ergab einen Wert von  $K_D = 0,2 \text{ nM} \pm 0,076 \text{ nM}$ . (C) Das Sensogramm zeigt die Interaktion der positiven Kontrolle (CHD4-Antikörper, 150 nm) und negativen Kontrolle (SAE-Antikörper, 150 nm) mit CHD4. (D) Das Sensogramm zeigt die Interaktion von Poly-dAdT (100 nM), dNTPs (100 nM) und DNA (100 nM) mit CHD4. Abbildung modifiziert nach der Originalpublikation (Guel et al., 2023).

### 1.3.3 CHD4 und zytoplasmatische DNA kolokalisieren in UV-bestrahlten Zellen

Die Menge von CHD4 und DNA in HaCaT-Zellen wurde unter verschiedenen Bedingungen gemessen. In unbehandelten HaCaT-Zellen ist im Zytoplasma praktisch keine DNA (rot fluoreszierend) vorhanden, während CHD4 (grün fluoreszierend) hauptsächlich im Zellkern und nur geringfügig perinukleär lokalisiert ist. In den UV-bestrahlten HaCaT-Zellen wurden CHD4 und DNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma verlagert. Die Lokalisationsmuster zeigen Überlappungen von CHD4 und DNA, die als gelbe Komplexe in der Abbildung 5B sichtbar werden. HaCaT-Zellen, die mit Lipofectamine (Lipo) und DNA + CHD4 transfiziert wurden, zeigten große gelbe Flecken rund um den Zellkern, die DNA-CHD4-Komplexe enthaltende Liposomen darstellen. In den ausschließlich transfizierten und nicht bestrahlten HaCaT-Zellen sind zusätzliche DNA und CHD4 außerhalb der großen Liposomen sichtbar (Abbildung 5C).



	Unbehandelt (HC)	UV-bestrahlt	Unbestrahlt + Transfiziert mit DNA/CHD4	UV-bestrahlt und transfiziert mit DNA/CHD4
Zytosolische DNA	(+)	+++	+	++
Zytosolisches CHD4	(+)	+++	++	++
Zytosolische DNA/CHD4- Komplexe	0	+++	+	++
Zytosolische Lipo- DNA/CHD4 Partikel	0	0	+++	+++

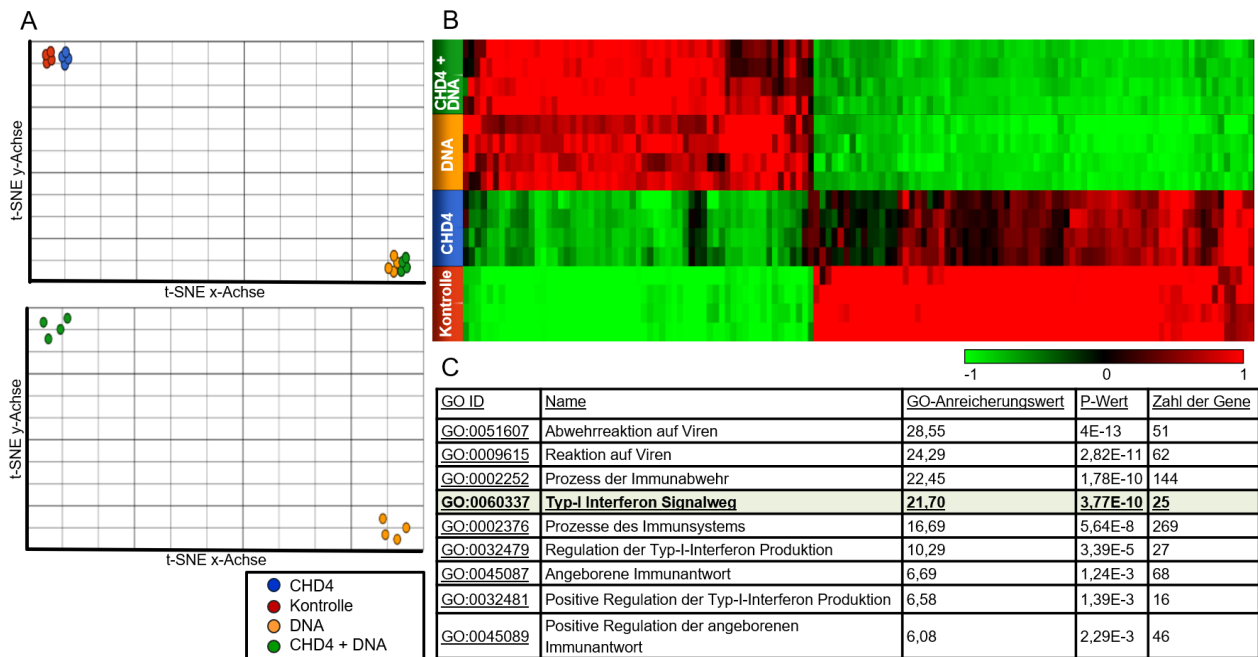
**Abb. 5:** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von HaCaT-Zellen, gefärbt mit DAPI (blau) und anti-CHD4 Antikörper (grün). Zytoplasmatische DNA-Motive sind mit dem Anti-DNA Antikörper (Klon AC-30-10) in roter Farbe dargestellt. UV-behandelte Zellen wurden mit 150 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Transfizierte Zellen wurden mit 12,5 µg/mL DNA, 2,4 µg/mL CHD4 und 15 µg/mL Lipofectamine (Lipo) stimuliert. (A) Unbehandelte Zellen mit nukleärem CHD4. (B) In UV-bestrahlten Zellen werden CHD4 und DNA in das Zytoplasma transloziert und kolokalisieren. (C) DNA + CHD4 transfizierte Zellen mit großen DNA-CHD4-Liposomen und wenigen translozierten DNA-CHD4-Komplexen. (D) DNA + CHD4 transfizierte und UV-bestrahlte Zellen mit großen DNA-CHD4-Liposomen und zahlreichen translozierten DNA-CHD4-Komplexen. Abbildung modifiziert nach der Originalpublikation (Guel et al., 2023):



#### 1.3.4 CHD4 erhöht die Immunogenität endogener DNA, indem es die Aktivierung des Typ-I IFN Signalwegs verstärkt

Für die RNA-Sequenzierung (RNAseq) wurde RNA aus HaCaT-Zellen verwendet, welche jeweils mit DNA, CHD4 oder DNA + CHD4 stimuliert wurden. In allen Fällen wurde Lipo als Transfektionsreagenz verwendet. Nach dem Alignment wurden die relevanten Gene nach p-Wert und dem Veränderungsfaktor, auch Fold Change genannt, gefiltert. Die Liste enthält insgesamt 2.130 verschiedene Gene. Die Verteilung der Messwerte wurde mittels einer t-verteilter stochastischen Nachbareinbettung (t-SNE) visualisiert, welche die Behandlungsgruppen als Cluster darstellt. Hierbei liegen die CHD4-transfizierten Zellen sowie die Kontrollgruppe eng beieinander und bilden dennoch zwei unterschiedliche Entitäten (Abbildung 6A). Ebenso liegen die Zellen, die mit DNA oder DNA + CHD4 stimuliert wurden, nahe beieinander, stellen aber zwei unterschiedliche Entitäten dar. Eine deutlichere Veränderung ist zu erkennen, wenn die DNA-stimulierten Zellen direkt mit denen verglichen werden, die mit DNA + CHD4 behandelt wurden, was eine Einheit der biologischen Replikate und einen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen zeigt.

Um die Auswirkungen auf die Genexpression zu untersuchen, wurde ein hierarchisches Clustering dieser Gene durchgeführt und in einer Heatmap dargestellt (Abbildung 6B). Die Heatmap zeigt, dass nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit DNA oder DNA + CHD4 zahlreiche Gene hochreguliert sind. Es ist zu bemerken, dass tendenziell dieselben Gene auch nach der Stimulation mit CHD4 allein hochreguliert sind. Andere Gene sind nach der Stimulation mit DNA oder DNA + CHD4 herunterreguliert. Die Stimulation von HaCaT-Zellen mit CHD4 allein zeigt einen ähnlichen Effekt wie die Stimulation mit endogener DNA, allerdings in geringerem Maße. In einem nächsten Schritt wurden die Gene, die nach der Stimulation mit DNA hochreguliert waren, auf ihre Funktion analysiert. Die biologische Relevanz der gefilterten Gene wurde mit Hilfe der Gen Ontologie (GO) Ressource untersucht. Die GO-Analyse zeigte, dass einige der am stärksten aktivierten Signalwege jene der angeborenen Immunantwort sind, wie virale Abwehrmechanismen durch die IFN-Signalkaskade (Abbildung 6C). Bezugnehmend auf die Pathogenese der DM wurde der „GO:0060337 Typ-I Interferon Signalweg“ analysiert, um zu untersuchen, ob die Gene nach der Stimulation durch CHD4 hoch- oder herunterreguliert werden. Alle Gene aus der Liste zeigen, nachdem sie mit CHD4 und DNA zusammen stimuliert wurden, eine höhere Expression im Vergleich zur Stimulation mit DNA allein.

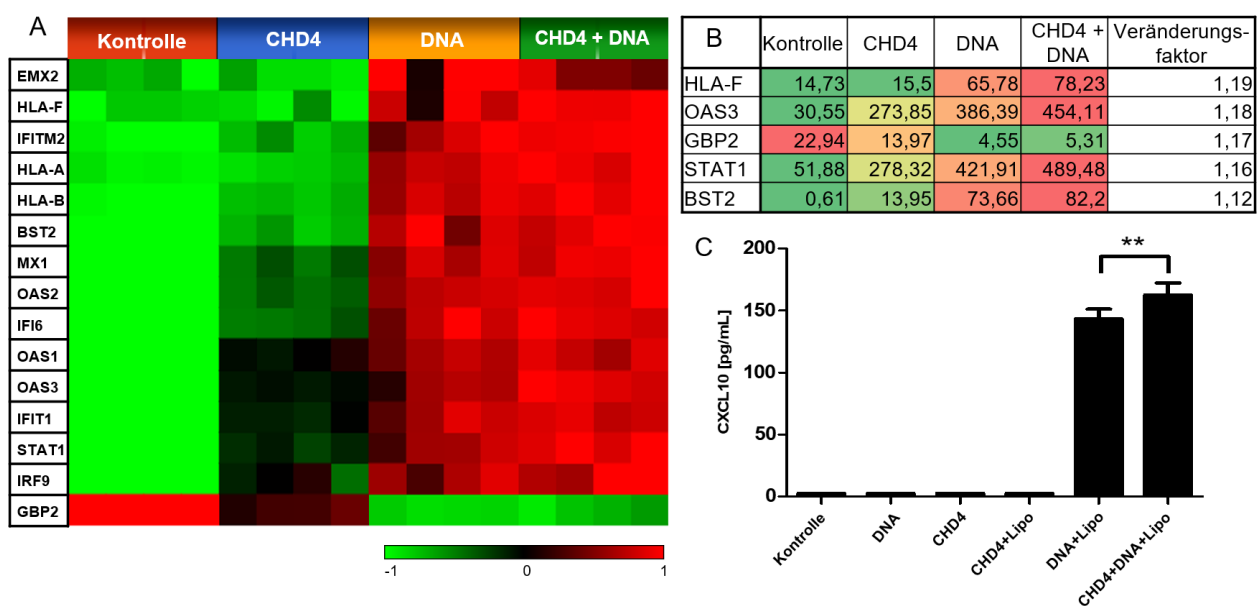


**Abb. 6:** CHD4 verstärkt die Aktivierung des Typ-I IFN Signalwegs und erhöht die Immunogenität endogener DNA in HaCaT-Zellen. HaCaT wurden mit endogener DNA (DNA), CHD4 (CHD4) oder mit einer Kombination aus DNA und CHD4 (DNA + CHD4) stimuliert und mit Lipofectamine (Lipo) transfiziert. Die Kontrolle (control) wurde ebenfalls mit Lipo transfiziert. Die Gene wurden wie folgt sortiert: p-Wert (control vs. DNA)  $\leq 0,01$ ; p-Wert (control vs. DNA + CHD4)  $\leq 0,01$ ; p-Wert (DNA + CHD4 vs. DNA)  $\leq 0,89$ ; Fold change (control vs. DNA)  $< -2$  oder  $> 2$ ; Fold change (control vs. DNA + CHD4)  $< -2$  oder  $> 2$ ; Fold change (DNA + CHD4 vs. DNA)  $< -1,2$  oder  $> 1$ . (A) t-verteilte stochastische Nachbareinbettung (t-SNE) für gefilterte Gene unter Verwendung der oben genannten Parameter als Einstellung (B) Hierarchisches Clustering differentiell exprimierter Gene von unbehandelten HaCaT-Zellen sowie solchen, die mit CHD4, DNA sowie CHD4 + DNA stimuliert wurden, in einer Heatmap. (C) Differenziell exprimierte Genfunktionen: Dargestellt ist eine Auswahl relevanter Genfunktionen aus der GO-Anreicherungsanalyse. Abbildung ergänzt und modifiziert nach der Originalpublikation (Guel et al., 2023).

Die Heatmap (Abbildung 7A) zeigt die Expression aller Gene in der „GO:0060337 Typ-I Interferon Signalweg“ Liste. Der kleinste quadratische Mittelwert (LSMean), definiert als die normalisierte Zahl der Genkopien pro Gruppe der fünf am stärksten hochregulierten IFN induzierbaren Gene zeigt, dass vier von fünf Genen auch durch die alleinige Stimulation mit CHD4 hochreguliert werden (Abbildung 7B).

Auf Proteinebene wurde die Menge des von HaCaT-Zellen produzierten CXCL10, eines charakteristischen Zytokins für Dermatomyositis (DM), mittels Sandwich-ELISA gemessen. Zellen, die mit DNA oder CHD4 ohne Transfektionsmittel behandelt wurden, zeigten keine höhere CXCL10-Konzentration im Überstand im Vergleich zum

Kontrollmedium (Abbildung 6E). Bei HaCaT-Zellen, die mit Lipo und CHD4 transfiziert wurden, konnte kein Anstieg der CXCL10-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 7C). Die Stimulation von HaCaT-Zellen mit DNA führt zu einer hohen Produktion von CXCL10. Es ist bemerkenswert, dass Zellen, die mit dem Autoantigen CHD4 und DNA gemeinsam transfiziert wurden, eine signifikant höhere Menge an CXCL10 produzieren als Zellen, die ausschließlich mit DNA transfiziert wurden (Abbildung 7C). CHD4 ist somit in der Lage, den aktivierenden Einfluss von DNA auf den Typ-I Interferon Signalweg in Keratinozyten zu verstärken.



**Abb. 7:** CHD4 verstärkt die Aktivierung des Typ-I IFN Signalwegs und erhöht die Immunogenität endogener DNA in HaCaT-Zellen. HaCaT wurden mit endogener DNA (DNA), CHD4 (CHD4) oder mit einer Kombination aus DNA und CHD4 (DNA + CHD4) stimuliert und mit Lipofectamine (Lipo) transfiziert. Die Kontrolle (control) wurde ebenfalls mit Lipo transfiziert. Die Gene wurden wie folgt sortiert: p-Wert (control vs. DNA)  $\leq 0,01$ ; p-Wert (control vs. DNA + CHD4)  $\leq 0,01$ ; p-Wert (DNA + CHD4 vs. DNA)  $\leq 0,89$ ; Fold change (control vs. DNA)  $< -2$  oder  $> 2$ ; Fold change (control vs. DNA + CHD4)  $< -2$  oder  $> 2$ ; Fold change (DNA + CHD4 vs. DNA)  $< -1,2$  oder  $> 1$ . (A + B) Hierarchisches Clustering in einer Heatmap und eine Tabelle zeigen die LSMeans (Mittelwert) der RNA-Menge der 15 am stärksten hochregulierten IFN induzierbaren Gene aus der Liste „GO:0060337 Typ-I Interferon Signalweg“. (C) HaCaT wurden unter den oben genannten Bedingungen stimuliert und CXCL10 nach 24 Stunden im Überstand mittels Sandwich-ELISA gemessen. Die biologischen Tests wurden an biologischen Replikaten ( $n = 4$ ) durchgeführt, die jeweils in doppelter Ausführung gemessen wurden. Die Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen Mann-Whitney U-Test gemessen (\*\* =  $p < 0.01$ ). Abbildung modifiziert nach der Originalpublikation (Guel et al., 2023).

## 1.3.5 Ergänzende Abbildung



**Abb. 8:** (Guel et al., 2023): Das Autoantigen CHD4 ist bei den drei Typ-I IFN gesteuerten Autoimmundermatosen DM, CDLE und LP signifikant hochreguliert und bei DM und CDLE in das Zytoplasma transloziert. Immunhistologische Färbungen zeigen die Expression von CHD4 bei verschiedenen Hauterkrankungen: Dermatomyositis (DM), chronisch diskoider Lupus erythematoses (CDLE), Lichen planus (LP), Psoriasis (Pso), atopische Dermatitis (AD) und gesunde Kontrollen (HC) (n = 5 für jede Untergruppe). Vergrößerung:  $\times 200$ .

## 1.4 Diskussion

### 1.4.1 Die Überexpression von CHD4 korreliert mit der IFN-Signatur von Hautkrankheiten

Die Untersuchung verdeutlicht, dass CHD4 bei den drei Typ-I IFN gesteuerten Autoimmundermatosen DM, CDLE und LP hochreguliert ist. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass Autoantigene unter IFN assoziierten Entzündungsbedingungen verstärkt exprimiert werden, da eine IFN-Signatur nicht nur für DM, sondern auch für LP und CDLE charakteristisch ist (Hornung und Wenzel, 2014; Love et al., 2009). Somit könnte CHD4 eine Rolle bei der Entstehung, Aufrechterhaltung oder Beendigung chronischer Entzündungsprozesse bei Hauterkrankungen spielen, die sich histologisch mit einer Interface Dermatitis zeigen.

Zusätzlich kann man in den Biopsien von DM, aber auch CDLE-Patienten eine Translokation des CHD4-Proteins in das Zytoplasma beobachten, jedoch nicht bei LP (Abbildung 8, Ergänzende Abbildung). DM und CDLE sind beides Erkrankungen, die mit einer Exazerbation unter UV-Licht einhergehen, wohingegen UV-Licht bei LP sogar als Therapieoption genutzt werden kann. (Love et al., 2009; Artuković et al., 2010; Pavlotsky et al., 2008; Dourmishev et al., 2004; Furukawa und Muto, 2009). Die prominenteste Translokation von CHD4 ist in DM-Hautbiopsien sichtbar, was auf einen Zusammenhang zwischen der CHD4-Translokation und der DM-Pathogenese hinweist. Nicht nur die Hochregulation von CHD4, sondern auch die Translokation und auch potentiell sich anschließende Mechanismen scheinen eine Rolle bei der Pathogenese zu spielen. Denn im Anschluss an die Translokation kann das zytoplasmatische CHD4 nicht mehr seine organische Wirkung der Transkriptionsregulation ausüben. Dies legt nahe, dass zytoplasmatisches CHD4 den Entzündungsweg bei DM auf andere Weise beeinflussen könnte.

### 1.4.2 Einfluss von UV-Licht auf die Pathogenese der Dermatomyositis

UV-Licht ist ein bekannter Umweltfaktor für die Exazerbation der DM, da es erythematöse Schübe auslösen und die Pathogenese auf verschiedenen Ebenen beeinflussen kann (Hornung und Wenzel, 2014; Betteridge et al., 2009; Kuhn und Beissert, 2005). Zum einen

hängt UV-Licht eng mit der Prävalenz von Anti-Mi2 AAK zusammen, wobei diese hochspezifisch für DM sind und so stark mit der Krankheitsaktivität korrelieren, dass sich der Anti-Mi-2 AAK-Spiegel sogar normalisieren kann, wenn die Krankheit weniger aktiv wird (Thompson et al., 2018; Pinal-Fernandez et al., 2019; Ghirardello et al., 2013). Die Intensität der terrestrischen Oberflächen-UV-Strahlung trägt zur relativen Prävalenz von DM bei und hängt auch stark mit dem Anteil von Anti-Mi- 2 AAK positiver DM zusammen (Okada et al., 2003). Hierbei zeigt sich mit zunehmender Breite, beispielsweise in Guatemala City, eine höhere Prävalenz von Anti-Mi-2 AAK positiver DM von 60%, wohingegen diese in Montreal nur 3% beträgt (Hengstman et al., 2000; Love et al., 2009; Okada et al., 2003; Mammen, 2010). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Intensität der UV-Strahlung und dem Anteil der DM-Patienten mit Antisynthetase AAK, Anti-SRP AAK oder Patienten ohne Myositis-spezifische AAK (Love et al., 2009).

Es ist bereits bekannt, dass das Mi-2 Protein CHD4 im Zellkern lokalisiert ist und Autoantigene nach UV-Bestrahlung hochreguliert und transloziert werden (Ghirardello et al., 2009; Caricchio et al., 2003). Nach UV-Bestrahlung wird der CHD4-Spiegel aufgrund einer höheren Translationseffizienz durch ein regulatorisches Element in der 5'-UTR Region der mRNA sowie durch eine erhöhte Proteinstabilität schnell hochreguliert und aufrechterhalten (Betteridge et al., 2009; Burd et al., 2008). Es kommen keine Antikörper gegen andere Mitglieder des NuRD-Komplexes vor und UV-Strahlung zeigt ebenso keine signifikanten Auswirkungen auf andere NuRD-Proteine, daher scheint CHD4 bei UV-Strahlung in DM unabhängig von diesen zu agieren (Betteridge et al., 2009).

Eine Möglichkeit der Freisetzung des CHD4 Autoantigens nach UV-Bestrahlung ist über Formen des Zelltods, die nicht der Apoptose entsprechen. Diese könnten durch Nekrose bei hohen UV-B-Dosen (80 mJ/cm<sup>2</sup>) entstehen oder durch Zelltodformen wie der Nekroptose oder Pyroptose (Caricchio et al., 2003; Utz et al., 1997; Casciola-Rosen und Rosen, 1997; Chen et al., 2022; You et al., 2022; Harberts et al., 2014). Ersteres geschieht beispielsweise bei den Autoantigenen Sm und Ku (beides AAK bei Kollagenosen), welche bei mittleren UV-Dosen auf der Zellmembran konzentriert werden, während der Zellkern noch sichtbar ist, dann bei hohen Dosen in das Zytoplasma transloziert und anschließend freigesetzt werden (Caricchio et al., 2003). Besonders interessant ist die Pyroptose,

welche auch durch UV-Strahlung ausgelöst werden kann und zu einer großen Menge an verfügbaren Autoantigenen führt (Chen et al., 2022; You et al., 2022). Zusätzlich kann UV-Strahlung die Immunsuppression beeinflussen und somit Autoimmunität durch die Induktion einer Typ-I-Interferon-Signatur und anderer Immunnetzwerke, welche die Pathogenese der DM beeinflussen, fördern. Dazu gehören Veränderungen von Stressproteinen, Interleukin-1, Interleukin-6, Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , NF- $\kappa$ B und Adhäsionsmolekül-Wegen (Grundtman und Lundberg, 2006; Murphy, 2000)

#### 1.4.4 Einfluss von Typ-I IFN auf den chronischen Entzündungszyklus in Dermatomyositis

In dieser Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass CHD4 eine hohe Affinität zur endogenen DNA aufweist und fähig ist, zytosolische CHD4-DNA-Komplexe zu bilden. Dies wird durch den Verlauf des Sensogramms weiter unterstützt, da es nur eine geringe Dissoziation der DNA-CHD4-Bindung im Laufe der Zeit zeigt (Abbildung 4A). In bestrahlten HaCaT-Zellen ist die Verlagerung von CHD4 und DNA aus dem Zellkern und die Bildung von zytosolischen CHD4-DNA-Komplexen zu beobachten (Abbildung 5). Der Effekt dieser Immunkomplexe zielt auf das IFN-System ab. Genau diese Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit hoher Expression von Typ-I IFN und IFN regulierten Proteinen ist ein wichtiger pathologischer Aspekt der DM (Hornung und Wenzel, 2014). Mit einer überschießenden Aktivierung des angeborenen Immunsystems, gefolgt von einer sekundären Dysregulation der adaptiven Immunantwort, kann ein zentrales Merkmal der Pathogenese der DM beschrieben werden.

Da Typ-I IFN eine sehr kurze Halbwertszeit haben, dienen Genexpressionsanalysen und IFN regulierte Proteine als geeignetere Biomarker. Dazu gehört das Typ-I IFN regulierte proinflammatorische Chemokin CXCL10, welches in DM-Hautläsionen erhöht ist (Hornung und Wenzel, 2014). Chemokine wie CXCL9 und CXCL10 können in der Dermis und Epidermis von DM-Läsionen nachgewiesen werden. CXCL10 wurde in mehreren Studien als zuverlässiger Surrogatmarker für Typ-I IFN gesteuerte Entzündungen verwendet (Scholtissek et al., 2017; Klaeschen und Wenzel, 2016; Wenzel et al., 2010). Daher eignet sich die Menge des CXCL10-Proteins in transfizierten Keratinozyten, um den immunstimulatorischen Effekt von CHD4 auf DNA auf Proteinebene zu untersuchen.

Wie in der t-SNE ersichtlich ist, wurden die mit CHD4 transfizierten Zellen getrennt von der Kontrolle geclustert. Das Gleiche gilt für die Cluster, die zusätzlich zu DNA mit CHD4 stimuliert wurden. Die separate Clusterbildung deutet darauf hin, dass CHD4 das Genexpressionsprofil von HaCaT-Zellen verändert. Sowohl DNA als auch CHD4 verstärken unabhängig voneinander wichtige genetische Signalwege des angeborenen Immunsystems, insbesondere den Typ-I IFN Signalweg. Hierbei ist zu sehen, dass CHD4 endogene DNA immunogener macht, indem es zu einer Hochregulierung von IFN regulierten Genen von bis zu 19 % führt. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da dieser Prozess im Zielgewebe, nämlich den Keratinozyten, stattfindet. Somit wird der Effekt durch die große Anzahl der Keratinozyten amplifiziert, was die Funktion von Keratinozyten auch als Zellen des körpereigenen Immunsystems nahelegt.

#### 1.4.5 Ausblick und weitere Einflussmechanismen von CHD4 auf die Pathogenese der Dermatomyositis in vivo

Wie bereits dargestellt, kann das hochregulierte und translozierte CHD4 nicht seiner nukleären Aufgabe als epidermale Homöostase kontrollierender Transkriptionsregulator nachgehen (Kashiwagi et al., 2017; Shibata et al., 2020). Stattdessen könnte der durch die UV-Strahlung ausgelöste Gewebeschaden durch fehlfunktionierende Heilung weitere Immunreaktionen auslösen, welche die Autoantigenexpression und Autoimmunität verstärken könnten (Suber et al., 2008).

Hierbei können CHD4-DNA-Komplexe im Zytoplasma nach zellulärem Stress, wie UV-Bestrahlung oder durch besondere Zelltodformen wie der Pyroptose im Zytoplasma entstehen (You et al., 2022). Diese Komplexe können dann entweder in den Zellen, in denen sie gebildet wurden, oder in Nachbarzellen eine weitere Immunreaktion auslösen, beispielsweise wenn geringe Mengen von DNA-CHD4-Komplexen über Mikrovesikel auf phagozytosebeeinträchtigte Nachbarzellen übertragen werden. Mikrovesikel sind kleine Bläschen, die während der Apoptose oder Aktivierung entstehen und Nukleinsäuren und verschiedene Komponenten aus ihren Ursprungszellen enthalten können (Chen et al., 2018). Die Aufnahme solcher Komplexe durch benachbarte Zellen könnte dann zur Aufrechterhaltung eines chronisch-entzündlichen Teufelskreises der DM-Autoimmunität beitragen, indem sie das angeborene Immunsystem wiederholt aktivieren.



Außerdem könnten posttranslationale Modifikationen eine große Rolle bei Immunkomplex vermittelten Reaktionen *in vivo* spielen. Dabei könnte die Erlangung von Adjuvans-Eigenschaften von Autoantigenen diese noch immunogener machen. Ein möglicher Mechanismus wären die post-apoptotischen Modifikationen von Autoantigenen, die in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (Caricchio et al., 2003; Targoff, 2000).

Hierbei spielt bei Myositis-Antigenen die Spaltung durch Granzym B eine Rolle. Granzym B ist eine Serinprotease, die zusammen mit Perforin in intrazellulären Granula von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen zu finden ist und Caspase abhängige Apoptose auslösen kann (Gleave und Granville, 2023). Jedoch spielt es auch in Zelltypen, die kein Perforin exprimieren, wie Mastzellen, Basophilen, Neutrophilen, B-Zellen, pDC, Makrophagen, CD4+ T-Zellen, regulatorischen T-Zellen und Keratinozyten eine Rolle (Hiroyasu et al., 2021a; Gleave und Granville, 2023). Hierbei akkumuliert Granzym B im extrazellulären Raum und kann dort seine proteolytische Aktivität auch an Myositis Antigenen wie CHD4 auslösen (Casciola-Rosen et al., 1999; Gleave und Granville, 2023). In gesunder Haut ist Granzym B wenig bis gar nicht vorhanden, jedoch in Autoimmunerkrankungen wie Alopecia areata, Pemphigus Gruppe, systemischer Sklerose und LE sowie DM erhöht exprimiert (Gleave und Granville, 2023). Bei einigen dieser Erkrankungen, wie dem Bullösen Pemphigoid, sind die Pathomechanismen und Konsequenzen der Spaltung durch Granzym B genau beschrieben, bei der DM hingegen bleibt die extrazelluläre Rolle noch unklar und sollte weiter erforscht werden (Velotti et al., 2020; Hiroyasu et al., 2021b).

Dies ist von besonderer Relevanz, da die Generierung neuer Antigene die positive Selektion von autoreaktiven T-Zellen und B-Zell-Klonen auslösen kann (Thompson et al., 2018). Als Reaktion könnten die neu entstandenen kryptischen Epitope auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen auf Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) der Klasse I oder II präsentiert werden und so die immunologische Toleranz überwinden sowie Autoimmunreaktionen auslösen (Thompson et al., 2018; Suber et al., 2008; Marzęcka et al., 2022). Durch diese beschriebenen Mechanismen des adaptiven Immunsystems könnte die Spirale der Autoimmunität weiter befeuert werden und Autoantigene wie CHD4 würden potentiell eine größere Rolle spielen als bisher angenommen.

## 1.5 Zusammenfassung

In dieser Forschungsarbeit wurde der Einfluss des Autoantigens CHD4 auf die Pathogenese von Dermatomyositis (DM) untersucht, einer idiopathischen entzündlichen Myopathie, die zu den Kollagenosen zählt. Die Pathogenese der DM umfasst eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit erhöhter Expression von Typ-I Interferon sowie einer sekundär dysregulierten adaptiven Immunantwort mit Autoantikörpern und Immunkomplexen. DM-Patienten weisen charakteristische Anti-Mi-2 Autoantikörper auf, die gegen das Chromodomänen-Helikase-DNA-bindende Protein 4 (CHD4) gerichtet sind. CHD4 ist physiologisch an der Regulation der Transkription auf chromosomaler Ebene beteiligt und fungiert als wichtiger transkriptioneller Korepressor, der die Genomintegrität im Zellkern sowie die epidermale Homöostase aufrechterhält.

Diese Arbeit zeigt, dass CHD4 in DM-Hautbiopsien immunhistochemisch stark hochreguliert ist und in das Zytoplasma von Keratinozyten transloziert wird. CHD4 kann endogene DNA mit sehr hoher Affinität ( $K_D = 0,2 \text{ nM} \pm 0,076 \text{ nM}$ ) binden und CHD4-DNA-Komplexe bilden, beispielsweise im Zytoplasma von UV-bestrahlten Keratinozyten. Diese CHD4-DNA-Komplexe aktivieren das angeborene Immunsystem in Keratinozyten, indem sie die Expression von Typ-I Interferon regulierten Genen und des funktionalen Proteins CXCL10 stärker erhöhen, als die Stimulation mit DNA allein.

Diese übermäßige Typ-I Interferon Aktivierung ist von besonderer Bedeutung, da sie im Zielgewebe, also den Keratinozyten, als häufigste Zelle der Epidermis stattfindet. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass CHD4 aufgrund der Überexpression und anschließenden Translokation nicht mehr seiner physiologischen Funktion der Erhaltung der Genomintegrität nachgehen kann, was die überschießende Immunantwort weiter fördern könnte. In vivo könnten zusätzliche Mechanismen der posttranslationalen Modifikation, beispielsweise die Spaltung durch Granzym B, eine Rolle spielen, welche potentiell zur Überwindung der immunologischen Toleranz führen und so Prozesse der Autoimmunität weiter vorantreiben könnten. Somit kann das Autoantigen CHD4 die Spirale der Autoimmunität durch Steigerung der Typ-I IFN gesteuerten Immunantwort in DM-Hautläsionen beeinflussen, jedoch spielen wahrscheinlich ebenso die oben genannten Mechanismen eine Rolle, welche Gegenstand zukünftiger Forschung sind.

## 1.6 Literaturverzeichnis

Artuković M, Ikić M, Kustelega J, Artuković IN, Kaliterna DM. Influence of UV radiation on immunological system and occurrence of autoimmune diseases. *Collegium antropologicum* 2010; 34 Suppl 2: 175–178

Bendewald MJ, Wetter DA, Li X, Davis MDP. Incidence of dermatomyositis and clinically amyopathic dermatomyositis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Arch Dermatol* 2010; 146: 26–30

Betteridge ZE, Gunawardena H, McHugh NJ. Pathogenic mechanisms of disease in myositis: autoantigens as clues. *Current opinion in rheumatology* 2009; 21: 604–609

Bogdanov I, Kazandjieva J, Darlenski R, Tsankov N. Dermatomyositis: Current concepts. *Clinics in dermatology* 2018; 36: 450–458

Bologna JL. *Dermatology*. Edinburgh: Elsevier Saunders 2017

Burbelo PD, Iadarola MJ, Alevizos I, Sapio MR. Transcriptomic Segregation of Human Autoantigens Useful for the Diagnosis of Autoimmune Diseases. *Molecular diagnosis & therapy* 2016; 20: 415–427

Burd CJ, Kinyamu HK, Miller FW, Archer TK. UV Radiation Regulates Mi-2 through Protein Translation and Stability. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 34976–34982

Caricchio R, McPhie L, Cohen PL. Ultraviolet B radiation-induced cell death: critical role of ultraviolet dose in inflammation and lupus autoantigen redistribution. *The Journal of Immunology* 2003; 171: 5778–5786

Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 1999; 190: 815–826

Casciola-Rosen L, Nagaraju K, Plotz P, Wang K, Levine S, Gabrielson E, Corse A, Rosen A. Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *The Journal of experimental medicine* 2005; 201: 591–601

Casciola-Rosen L, Rosen A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus* 1997; 6: 175–180

Chen Y, Li G, Liu M-L. Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 2018

Chen Y-Y, Lee Y-H, Wang B-J, Chen R-J, Wang Y-J. Skin damage induced by zinc oxide nanoparticles combined with UVB is mediated by activating cell pyroptosis via the NLRP3 inflammasome-autophagy-exosomal pathway. *Particle and fibre toxicology* 2022; 19: 2

Cobos GA, Femia A, Vleugels RA. Dermatomyositis: An Update on Diagnosis and Treatment. *American journal of clinical dermatology* 2020; 21: 339–353

Cruellas MG, Viana VS, Levy-Neto M, Souza FH, Shinjo SK. Myositis-specific and myositis-associated autoantibody profiles and their clinical associations in a large series of patients with polymyositis and dermatomyositis. *Clinics* 2013; 68: 909–914

Dalakas MC. Inflammatory muscle diseases. *The New England journal of medicine* 2015; 372: 1734–1747

DeWane ME, Waldman R, Lu J. Dermatomyositis: Clinical features and pathogenesis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2020; 82: 267–281

Dourmishev L, Meffert H, Piazena H. Dermatomyositis: comparative studies of cutaneous photosensitivity in lupus erythematosus and normal subjects. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 2004; 20: 230–234

Fornaro M, Girolamo F, Cavagna L, Franceschini F, Giannini M, Amati A, Lia A, Tampoia M, D'Abbicco D, Maggi L, Fredi M, Zanframundo G, Moschetti L, Coladonato L, Iannone F. Severe muscle damage with myofiber necrosis and macrophage infiltrates characterize anti-Mi2 positive dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2021; 60: 2916–2926

Furukawa F, Muto M. Ethnic differences in immunogenetic features and photosensitivity of cutaneous lupus erythematosus. *Archives of Dermatological Research* 2009; 301: 111–115

Ghirardello A, Bassi N, Palma L, Borella E, Domeneghetti M, Punzi L, Doria A. Autoantibodies in polymyositis and dermatomyositis. *Current rheumatology reports* 2013; 15: 335

Ghirardello A, Zampieri S, Iaccarino L, Tarricone E, Bendo\* R, Gambari PF, Doria A. Anti-Mi-2 antibodies. *Autoimmunity* 2009; 38: 79–83

Gleave A, Granville DJ. Granzyme B in Autoimmune Skin Disease. *Biomolecules* 2023; 13

Gono T, Kuwana M. Current understanding and recent advances in myositis-specific and -associated autoantibodies detected in patients with dermatomyositis. *Expert review of clinical immunology* 2020; 16: 79–89

Grundtman C, Lundberg IE. Pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Current rheumatology reports* 2006; 8: 188–195

Guel T, Scholtissek B, Siegl J, Fetter T, Mayer G, Bieber T, Wenzel J. Dermatomyositis autoantigen CHD4 forms immune stimulatory complexes with endogenous DNA. *Experimental Dermatology* 2023

Harberts E, Fischelevich R, Liu J, Atamas SP, Gaspari AA. MyD88 mediates the decision to die by apoptosis or necroptosis after UV irradiation. *Innate immunity* 2014; 20: 529–539

Hengstman GJ, van Venrooij WJ, Vencovsky J, Moutsopoulos HM, van Engelen BG. The relative prevalence of dermatomyositis and polymyositis in Europe exhibits a latitudinal gradient. *Annals of the rheumatic diseases* 2000; 59: 141–142

Hiroyasu S, Hiroyasu A, Granville DJ, Tsuruta D. Pathological functions of granzyme B in inflammatory skin diseases. *Journal of dermatological science* 2021a; 104: 76–82

Hiroyasu S, Zeglinski MR, Zhao H, Pawluk MA, Turner CT, Kasprick A, Tateishi C, Nishie W, Burleigh A, Lennox PA, van Laeken N, Carr NJ, Petersen F, Crawford RI, Shimizu H, Tsuruta D, Ludwig RJ, Granville DJ. Granzyme B inhibition reduces disease severity in autoimmune blistering diseases. *Nature communications* 2021b; 12: 302

Hornung T, Wenzel J. Innate immune-response mechanisms in dermatomyositis: an update on pathogenesis, diagnosis and treatment. *Drugs* 2014; 74: 981–998

Jorizzo JL. Dermatomyositis. *Arch Dermatol* 2002; 138

Kao L, Chung L, Fiorentino DF. Pathogenesis of dermatomyositis: role of cytokines and interferon. *Current rheumatology reports* 2011; 13: 225–232

Kashiwagi M, Hosoi J, Lai J-F, Brissette J, Ziegler SF, Morgan BA, Georgopoulos K. Direct control of regulatory T cells by keratinocytes. *Nature immunology* 2017; 18: 334–343

Klaeschen AS, Wenzel J. Upcoming therapeutic targets in cutaneous lupus erythematosus. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 2016; 9: 567–578

Kuhn A, Beissert S. Photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2005; 38: 519–529

Liang L, Zhang Y-M, Chen H, Ye L-F, Li S-S, Lu X, Wang G-C, Peng Q-L. Anti-Mi-2 antibodies characterize a distinct clinical subset of dermatomyositis with favourable prognosis. *European journal of dermatology : EJD* 2020

Love LA, Weinberg CR, McConnaughey DR, Oddis CV, Medsger TA, Reveille JD, Arnett FC, Targoff IN, Miller FW. Ultraviolet radiation intensity predicts the relative distribution of dermatomyositis and anti-Mi-2 autoantibodies in women. *Arthritis & Rheumatism* 2009; 60: 2499–2504

Mammen AL. Dermatomyositis and polymyositis: Clinical presentation, autoantibodies, and pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010; 1184: 134–153

Marzęcka M, Niemczyk A, Rudnicka L. Autoantibody Markers of Increased Risk of Malignancy in Patients with Dermatomyositis. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2022

Murphy GM. Ultraviolet radiation and its effects on the immune system. *Clinical and experimental dermatology* 2000; 25: 162–163

Okada S, Weatherhead E, Targoff IN, Wesley R, Miller FW. Global surface ultraviolet radiation intensity may modulate the clinical and immunologic expression of autoimmune muscle disease. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48: 2285–2293

Pavlotsky F, Nathansohn N, Kriger G, Shpiro D, Trau H. Ultraviolet-B treatment for cutaneous lichen planus: our experience with 50 patients. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 2008; 24: 83–86

Pinal-Fernandez I, Mecoli CA, Casal-Dominguez M, Pak K, Hosono Y, Huapaya J, Huang W, Albayda J, Tiniakou E, Paik JJ, Johnson C, Danoff SK, Corse AM, Christopher-Stine L, Mammen AL. More prominent muscle involvement in patients with dermatomyositis with anti-Mi2 autoantibodies. *Neurology* 2019; 93: e1768-e1777

Scholtissek B, Zahn S, Maier J, Klaeschen S, Braegelmann C, Hoelzel M, Bieber T, Barchet W, Wenzel J. Immunostimulatory Endogenous Nucleic Acids Drive the Lesional Inflammation in Cutaneous Lupus Erythematosus. *Journal of Investigative Dermatology* 2017; 137: 1484–1492

Shibata S, Kashiwagi M, Morgan BA, Georgopoulos K. Functional interactions between Mi-2 $\beta$  and AP1 complexes control response and recovery from skin barrier disruption. *The Journal of experimental medicine* 2020; 217

Stuhlmüller B, Schneider U, González-González J-B, Feist E. Disease Specific Autoantibodies in Idiopathic Inflammatory Myopathies. *Frontiers in neurology* 2019; 10: 438

Suber TL, Casciola-Rosen L, Rosen A. Mechanisms of Disease: autoantigens as clues to the pathogenesis of myositis. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2008; 4: 201–209

Swafford C, Roach ES. Juvenile Dermatomyositis and the Inflammatory Myopathies. *Seminars in neurology* 2020; 40: 342–348

Tanboon J, Inoue M, Hirakawa S, Tachimori H, Hayashi S, Noguchi S, Suzuki S, Okiyama N, Fujimoto M, Nishino I. Pathologic Features of Anti-Mi-2 Dermatomyositis. *Neurology* 2021; 96: e448-e459

Targoff IN. Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Current opinion in rheumatology* 2000; 12: 475–481

Thompson C, Piguet V, Choy E. The pathogenesis of dermatomyositis. *British Journal of Dermatology* 2018; 179: 1256–1262

Utz PJ, Hottel M, Schur PH, Anderson P. Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine* 1997; 185: 843–854

Velotti F, Barchetta I, Cimini FA, Cavallo MG. Granzyme B in Inflammatory Diseases: Apoptosis, Inflammation, Extracellular Matrix Remodeling, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrosis. *Frontiers in Immunology* 2020; 11: 587581

Wenzel J, Wörenkämper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T, Tüting T. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *The Journal of pathology* 2005; 205: 435–442

Wenzel J, Zahn S, Tüting T. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: common and different features in distinct subsets. *Lupus* 2010; 19: 1020–1028

You R, He X, Zeng Z, Zhan Y, Xiao Y, Xiao R. Pyroptosis and Its Role in Autoimmune Disease: A Potential Therapeutic Target. *Frontiers in Immunology* 2022; 13: 841732

## 2. Veröffentlichung



Received: 9 August 2022 | Revised: 9 March 2023 | Accepted: 20 March 2023

DOI: 10.1111/exd.14799

RESEARCH ARTICLE

Experimental Dermatology | WILEY

# Dermatomyositis autoantigen CHD4 forms immune stimulatory complexes with endogenous DNA

Tugce Guel<sup>1</sup> | Benedikt Scholtissek<sup>1</sup> | Julia Siegl<sup>2</sup> | Tanja Fetter<sup>1</sup> | Günter Mayer<sup>2</sup> | Thomas Bieber<sup>1</sup> | Joerg Wenzel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology and Allergy, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

<sup>2</sup>Life and Medical Sciences Institute, University of Bonn, Bonn, Germany

### Correspondence

Joerg Wenzel, Department of Dermatology and Allergy, University of Bonn, Sigmund-Freud-Strasse 25, 53105 Bonn, Germany.  
Email: [joerg.wenzel@ukbonn.de](mailto:joerg.wenzel@ukbonn.de)

### Abstract

Dermatomyositis (DM) is an idiopathic inflammatory myopathy belonging to the spectrum of autoimmune connective tissue diseases. DM patients present with antinuclear antibodies against Mi-2, also known as Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 (CHD4). CHD4 is upregulated in DM skin biopsies and could potentially affect DM pathophysiology as it binds endogenous DNA with a high affinity ( $KD=0.2\text{nM}\pm 0.076\text{nM}$ ) and forms CHD4-DNA complexes. The complexes are localized in the cytoplasm of UV-radiated and transfected HaCaTs and amplify the expression of interferon (IFN) regulated genes and the amount of functional CXCL10 protein stronger than DNA alone. The enhancement of the type I IFN pathway activation in HaCaTs through CHD4-DNA signalling suggests a possible mechanism for the sustainment of the pro-inflammatory vicious cycle in DM skin lesions.

### KEYWORDS

autoantigen, autoimmunity, dermatomyositis, interferon, Mi-2 nucleosome Remodelling and deacetylase complex

## 1 | INTRODUCTION

Dermatomyositis (DM) belongs to the spectrum of autoimmune connective tissue diseases (AI-CTDs) and is mediated by antibodies or immune complexes. DM patients commonly present with antinuclear antibodies (ANA), including anti-Mi-2 autoantibodies (aAb) which are directed against Chromodomain-helicase-DNA-binding 4 (CHD4) protein. DM affects both children and adults, with one peak of incidence between 5 and 12 years of age for the juvenile type as well as one between 40 and 60 years of age for the adult type.<sup>1,2</sup> The incidence of DM ranges from two to nine per million people depending on the investigated population.<sup>3-6</sup> Both the adult and juvenile DM type present similarly with the main difference being the association of the adult DM with malignancy.<sup>7</sup> DM is characterized

by symmetric, proximal, extensor inflammatory myopathy and a characteristic cutaneous eruption.<sup>1,6</sup> The clinical features that are considered pathognomonic for DM include the Heliotrope sign and Gottron papules. The histopathological changes in DM patients' skin biopsies include epidermal atrophy and signs of interface dermatitis seen as apoptosis of epidermal basal and colloid bodies.<sup>6,8</sup>

The prevalence of aAb in DM patients is 34.4% for myositis-specific aAb and 41.4% for myositis-associated aAb as shown in a cross-sectional study of 222 patients.<sup>9</sup> Most frequent DM-specific aAb are Anti-Mi-2, Anti-MDA5, Anti-SAE, Anti-NXP-2, Anti-SRP, Anti-TIF-1 $\gamma$  or Anti-aminoacyl-tRNA synthetases like anti-Jo1 and anti-PL-7.<sup>6,10</sup> DM-associated antibodies like anti-Ro/SSA are also commonly found in other autoimmune diseases including lupus erythematosus (LE).<sup>8</sup> Most aAb found in AI-CTD are ANA. ANA target

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDeriv](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2023 The Authors. *Experimental Dermatology* published by John Wiley & Sons Ltd.



cellular structures that are essential for the cellular function such as DNA. Serum levels of myositis-specific aAb correlate with disease activity and are upregulated in association with different phenotypes.<sup>11</sup> In 30% of patients, the anti-Mi-2 aAb levels normalize as the disease becomes less active.<sup>12</sup>

Anti-Mi-2 aAb are a serologic hallmark of idiopathic inflammatory myopathies and have a diagnostic sensitivity of approximately 4%–18% and specificity of 98%–100%.<sup>13</sup> The prevalence of anti-Mi-2 aAb estimates in a range from 4% to 35%.<sup>1</sup> The cutaneous manifestations associated with anti-Mi-2 DM in adults include facial dermatosis, shawl sign, poikiloderma and Gottron papules.<sup>1,6,9</sup> Despite a clinically mild myopathy being the hallmark of anti-Mi-2 aAb, these patients frequently have CK elevations that are out of proportion to their degree of muscle involvement.<sup>1,6,9</sup> Whereas the more severe cutaneous features of DM such as calcinosis, ulcerative vasculopathy or systemic manifestations like interstitial lung disease are not commonly seen in this clinical subset.<sup>1,14</sup> The association between anti-Mi-2 aAb and an increased risk of malignancy in DM remains controversial, with studies reporting contrary results.<sup>15</sup>

Anti-Mi-2 aAb recognize CHD4 protein, a part of the nucleosome remodelling-deacetylase (NuRD) complex, which is a multi-subunit protein complex that is involved in transcription regulation at the chromosomal level and functions as a key transcriptional corepressor.<sup>16</sup> CHD4 has proven to have many crucial functions such as in T-cell development, for differentiation of immature thymocytes, for developmental expression of CD4 and for cell divisions in mature T cells.<sup>17</sup> CHD4 is also essential for early B-cell development, as CHD4 represses p53 expression and promotes B-cell proliferation.<sup>18</sup> Additionally, CHD4 has been found to control epidermal homeostasis by regulating the genes involved in keratinocyte and immune-cell activation, since loss of CHD4 in the epidermis causes keratinocyte activation and skin inflammation.<sup>19</sup> The skin needs to quickly respond to environmental exposure through rapidly inducing signaling and transcriptional programs. CHD4 was identified to regulate those skin's stress responses by restricting chromatin access at enhancers associated with stress response genes.<sup>19,20</sup>

The pathogenesis of DM is multifactorial, complex and incompletely understood. Genetic, environmental and immune mechanisms including aAb are thought to play a role.<sup>1</sup> The activation of the innate immune system with high expression of interferons (IFNs) and IFN-regulated proteins together with a secondary dysregulation of the adaptive immune response is a central feature of the pathogenesis of DM.<sup>8</sup> The lesional skin inflammation shows a high expression of type I IFN-regulated pro-inflammatory genes including Mx1 protein and chemokines like CXCL9 and CXCL10.<sup>8</sup> The immunological response is most likely triggered by environmental factors such as UV exposure, drugs, infection and lifestyle decisions in genetically susceptible individuals.<sup>1</sup> UV-radiation is a widely accepted environmental factor that is accountable for the disease exacerbation in DM.<sup>21,22</sup> Therefore, the expression of CHD4 in UV-radiated keratinocytes might contribute to autoimmunity and subsequently to a DM phenotype.<sup>23</sup> Apart from IFN-signature, complement activation is also thought to influence the disease.<sup>2</sup>

The induction of the immune response is most likely triggered by myositis specific antigens. The expression of the autoantigen Mi-2 is significantly increased (around 10-fold) in muscle biopsies only from patients with DM, not Polymyositis. Interestingly, Mi2 antigens were present in 60% of muscle biopsy from DM patients, but only 20% of DM patients have anti-Mi-2 aAb.<sup>24</sup> This suggests that a DM-specific pattern of autoantigen expression, meaning levels of CHD4 in the target tissue, for example keratinocytes or myocytes, could potentially regulate and shape the autoimmune response associated with the particular phenotype.<sup>16,25</sup> Previous studies have already indicated that changes in phenotype-specific autoantigens, such as altered structure, enhanced expression and acquisition of adjuvant properties during various forms of cellular stress, apoptosis and transformation, could potentially be mechanistically important in the pathogenesis of certain diseases. Such structural changes allow initiation of immune responses to epitopes not generated during tolerance induction.<sup>15,16</sup> The association of myositis autoantigens with nucleic acids causes them to be more likely to stimulate IFN type I secretion, which can increase antigen availability and propagation of the immune response.<sup>11</sup>

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Patients and skin samples

Lesional skin biopsy samples were taken from patients with active, untreated dermatomyositis (DM), chronic discoid lupus erythematosus (CDLE), lichen planus (LP), psoriasis (Pso), atopic dermatitis (AD) and healthy controls (HC) all with  $n=5$ . Healthy control specimens were obtained from healthy skin of five patients undergoing plastic surgery. All patients gave signed consent, and the study was approved by the Local Ethics Committee in Bonn, Germany, (No. 09004), also fulfilling the Declaration of Helsinki principles.

### 2.2 | Histology and immunohistology

All sections were prepared from formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsy samples. Standard H & E stain and periodic acid Schiff staining were performed. For Immunohistology, anti-CHD4 antibody (ABIN560357 antibodies-online) and REAL staining kit (Dako, Glostrup) with fast red as chromogen were used. A semi-quantitatively scale was employed to rank the protein expression from 0 to 3 (0=no expression; 1=weak expression; 2=fair expression; and 3=strong expression) as described before.<sup>26</sup>

### 2.3 | Cell stimulation and cytokine measurement

Spontaneously immortalized human keratinocytes (HaCaTs) were cultured with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

containing 4500mg/L D-glucose and L-glutamine, without sodium pyruvate, supplemented with 100U/mL penicillin-streptomycin and 10% foetal calf serum.  $1.0 \times 10^5$  HaCaTs were stimulated with CHD4/Mi2 protein (2.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from ProSpec (Revohot, Israel) and DNA (12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) isolated from HaCaTs with the NucleoSpin® Tissue Purification Kit (Macherey-Nagel, Dueren). Lipofectamine 2000 (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, served as transfection reagent. CXCL10 protein was measured within the supernatants of cells 24h after stimulation.

## 2.4 | Immunofluorescence

$0.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> were left to adhere on a Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide-System (#177402, Thermo Fisher Scientific) that was previously coated with Coating Matrix Kit (R-011-K, Thermo Fisher Scientific). The cells were either left untreated, UV radiated with an Ultramed 400W broadband UV lamp emitting 150mJ/cm<sup>2</sup> or transfected according to the cell stimulation protocol and incubated for 4h in serum free DMEM medium. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde, washed in PBS, boiled at 90°C in pH9 Target Retrieval Solution, permeabilized with 0.1% Triton and then blocked with 5% BSA. The used primary antibodies are mouse IgM anti-DNA (diluted 1:45, 1h RT, AC-30-10, Chemicon International, Temecula) and the anti-human monoclonal mouse IgG anti-CHD4/Mi2 (diluted 1:70, 16h 4°C, ABIN560357 antibodies-online, Aachen). The convenient secondary antibody for the DNA-antibody is anti-mouse-IgM eFluor®660-conjugated (diluted 1:40, 1h RT, 50-5790, Affymetrix, Santa Clara) and for CHD4 antibody Anti-Mouse IgM eFluor® 660 (diluted 1:500, 1h RT, abcam, Cambridge). Mounting was achieved with Fluoromount-G™. Images were captured with the Axio Observer.Z1, which is equipped with an ApoTome2 and a Colibri2 LED-light-source (all from Carl Zeiss, Oberkochen). For excitation wavelengths 353nm (DAPI), 493nm (FITC/eFluor®488) and 653nm (eFluor®660) were used. A semi-quantitative scale was used to rank the presence of fluorescent signal from the investigated target from 0 to +++ (0=no expression; +=weak presence only in selective cells; +=weak presence; ++=fair presence; +++=strong presence).

## 2.5 | Binding affinity studies using surface plasmon resonance

The experiments were performed at 37°C using a Biacore™ 3000 (GE Healthcare) instrument and Poly-NTA derivatized linear polycarboxylate hydrogel with high affinity biosensor chips (NiHC200M, XanTec, Düsseldorf). All buffers are from the buffer kit for NiHC sensor chips (KNiH-50, XanTec, Düsseldorf). Flow cell 1 (FC1) was used as the reference flow cell, which was left unmodified. Flow cell 2 (FC2) was used for immobilization of the protein. For the final measurement, both flow cells were conditioned with 5min injections of immobilization buffer (at 8  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) and washed 2min

with running buffer (at 8  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). To FC2, then the NiCl<sub>2</sub> loading buffer was injected for 6min (at 8  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) leading to a baseline increase over 300 response units (RU) and afterwards washed again for 2min. The protein was then injected over a 4min (at 8  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) period. Unbound protein was washed off with running buffer to stabilize the baseline. The protein-DNA binding assay was performed in running buffer at a flow rate of 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . DNA solutions diluted in sample buffer ranging from 0.1 to 500nM were injected for 2min. The sensor chip was regenerated to remove any remaining bound material by injecting the EDTA Regeneration buffer for 4min (20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) and then NaOH elution buffer for 3min (20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Binding was detected by subtracting unspecific binding of FC1 from FC2.

## 2.6 | Gene expression essay

HaCaTs were stimulated with 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA isolated from HaCaTs with the NucleoSpin® Tissue Purification Kit (Macherey-Nagel, Dueren), 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CHD4 from ProSpec (Revohot) or stimulated with DNA (12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + CHD4 (1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and were all transfected with 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific). The isolated RNA (Nucleospin RNA Kit by Macherey & Nagel) was amplified using Qubit, and the library was prepared with the QuantSeq 3'-mRNA Library Prep kit by Lexogen. For RNA sequencing, Illumina HiSeq 2500 sequencing system was used. For analysis, Partek Software was used with default conditions. STAR was used and aligned to Homo sapiens (human)-hg19\_chr22 (whole genome).

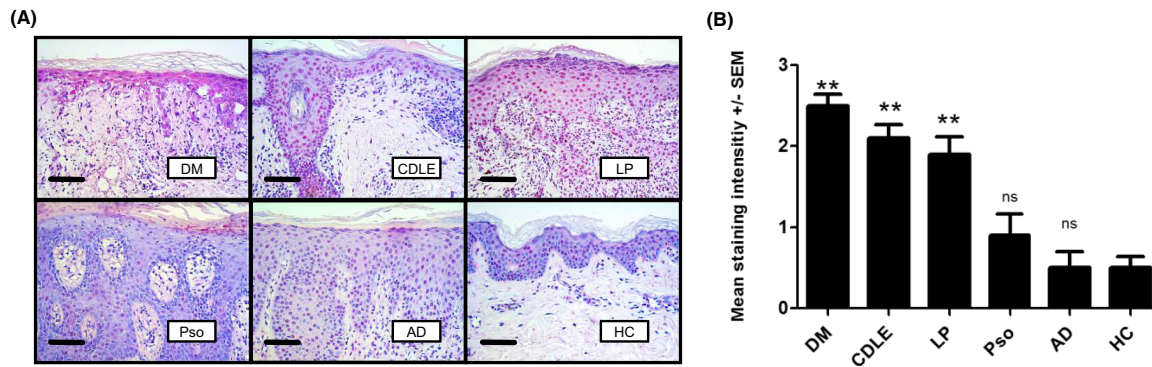
## 2.7 | Statistical procedures

GraphPad Prism 5 was used for all types of statistical analyses of the in vitro experiments. Nonparametric Mann-Whitney U-test was used for all analyses. For the statistics of the mean scoring values of stained CHD4 in AI-CTD, we used a one-tailed Mann-Whitney U-test with the hypothesis that CHD4 expression is higher in AI-CTD. For the expression of CXCL10 in stimulated HaCaTs, we used a two-tailed Mann-Whitney U-test. The Spearman's  $\rho$ .  $p$ -levels of <0.05 were considered to be significant (\*),  $p$ -levels <0.01 as highly significant (\*\*) and  $p$ -levels of <0.001 as the most significant (\*\*\*)

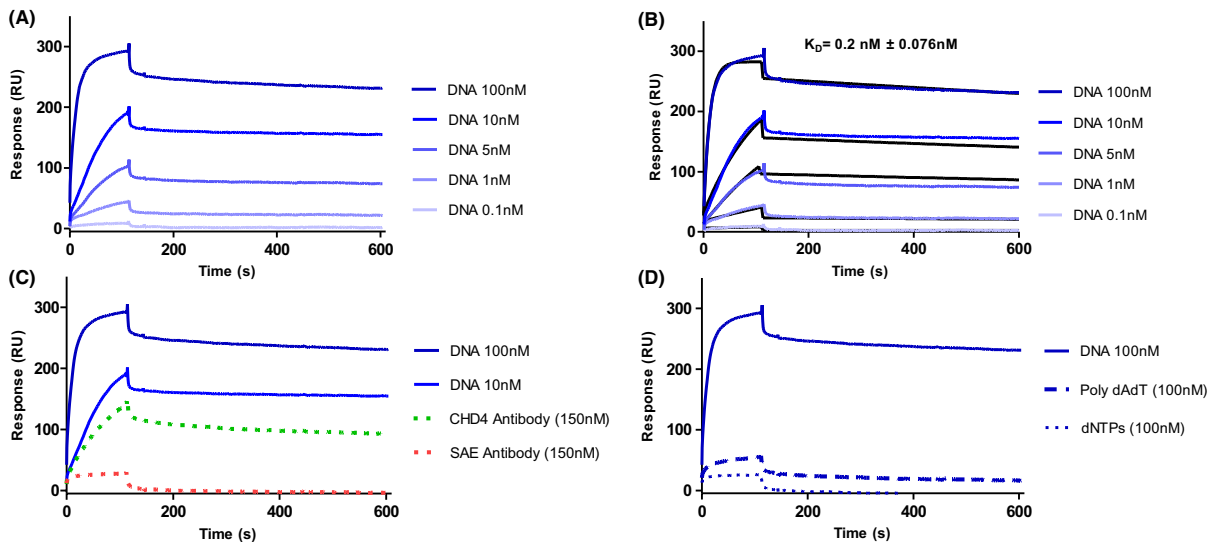
## 3 | RESULTS

### 3.1 | CHD4 is significantly upregulated in the three AI-CTDs; DM, CDLE and LP

Proteinaceous CHD4 is stained in patient skin biopsies from five different dermatological diseases (Figure 1A). The set includes three IFN-regulated, cutaneous autoimmune diseases being dermatomyositis (DM), chronic discoid lupus erythematosus (CDLE) and lichen planus (LP) as well as two diseases with different aetiology being psoriasis (Pso) and atopic dermatitis (AD). The diseased skin biopsies were



**FIGURE 1** Autoantigen CHD4 is significantly upregulated in the three AI-CTDs; DM, CDLE and LP.(A). Representative immunohistologic micrographs showing the expression of CHD4 in different skin diseases: dermatomyositis (DM), chronic discoid lupus erythematosus (CDLE), lichen planus (LP), psoriasis (Pso), atopic dermatitis (AD) and healthy control (HC) ( $n=5$  for each subset). Original magnification:  $\times 200$ , scale bar = 0.1 mm. (B). Mean scoring values of those IHC-stained proteinaceous CHD4 in different skin diseases and HC. Asterisks indicate the level of significance in comparison with HC. Statistical analyses were performed using one tailed Mann-Whitney U-test ( $*=p<0.05$ ;  $**=p<0.01$ ; ns = not significant).



**FIGURE 2** Sensogram for the binding of CHD4 to genomic DNA, Poly-dAdT, dNTPs and CHD4/SAE-Antibody. (A). Sensogram for different DNA concentrations (0.1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM) binding to CHD4 protein (B). Calculation of  $K_D$  via Langmuir 1:1 binding shows  $K_D = 0.2 \text{ nM} \pm 0.076 \text{ nM}$  (C). Sensogram of positive control (CHD4 antibody, 150 nM) and negative control (SAE antibody, 150 nM) (D). Sensogram of Poly-dAdT (100 nM), dNTPs (100 nM) and DNA (100 nM) binding to CHD4.

compared to healthy controls (HC). CHD4 is significantly upregulated in DM, CDLE and LP compared to the healthy controls (Figure 1B). The staining pattern suggests a high expression of CHD4 in the epidermis. DM shows the highest staining intensity of CHD4 with an approximate fivefold increase compared to the healthy controls (Figure 1B). There is no significant difference of CHD4 staining between either AD or Pso and the healthy control. In addition to the nuclear staining pattern, a strong cytoplasmic staining can be observed in DM and CDLE, as well as light cytoplasmic staining in LP (Figure S1). The staining of the cytoplasm is most prominent within the lesions of the skin diseases (Figure 1A).

### 3.2 | CHD4 binds to DNA in a concentration-dependent manner with a $K_D$ of $0.2 \text{ nM} \pm 0.076 \text{ nM}$

DNA binds to CHD4 in a concentration-dependent manner (Figure 2A,B). Affinity determination of the concentration specific binding of DNA to CHD4 protein reveals a  $K_D$  of  $0.2 \text{ nM} \pm 0.076 \text{ nM}$ . Interestingly, the binding of the DNA to the protein is very tight, as nearly no dissociation can be observed (Figure 2A). As anticipated, the CHD4-specific antibody shows binding and the SAE antibody does not show a specific interaction to CHD4 (Figure 2C). Poly-dAdT showed less interaction to CHD4 than endogenous DNA at

the same concentration (Figure 2D). With this method no interaction of dNTPs at 100nM (Figure 2D) to CHD4 could be detected, which is due to the small size of the non-polymerized nucleotides and the mass dependence of surface plasmon resonance.

### 3.3 | CHD4 and cytoplasmic DNA colocalize in UV radiated cells

We quantified the amount of CHD4 and DNA in HaCaTs under different conditions. In the untreated HaCaTs, there is close to no DNA in the cytoplasm and CHD4 localized mainly in the nucleus and only slightly perinuclear. In the UV radiated HaCaTs, CHD4 and DNA were translocated from the nucleus into the cytoplasm. Interestingly, patterns of CHD4 and DNA overlap which can be seen by yellow complexes in the microscopy pictures (Figure 3B). HaCaTs that were transfected with Lipofectamine (Lipo) and DNA+CHD4 showed liposomes containing DNA-CHD4 complexes visible as big yellow spots located around the nucleus. In those transfected and not radiated HaCaTs, there is additional DNA and CHD4 visible outside of the big liposomes (Figure 3C). HaCaTs that were radiated and

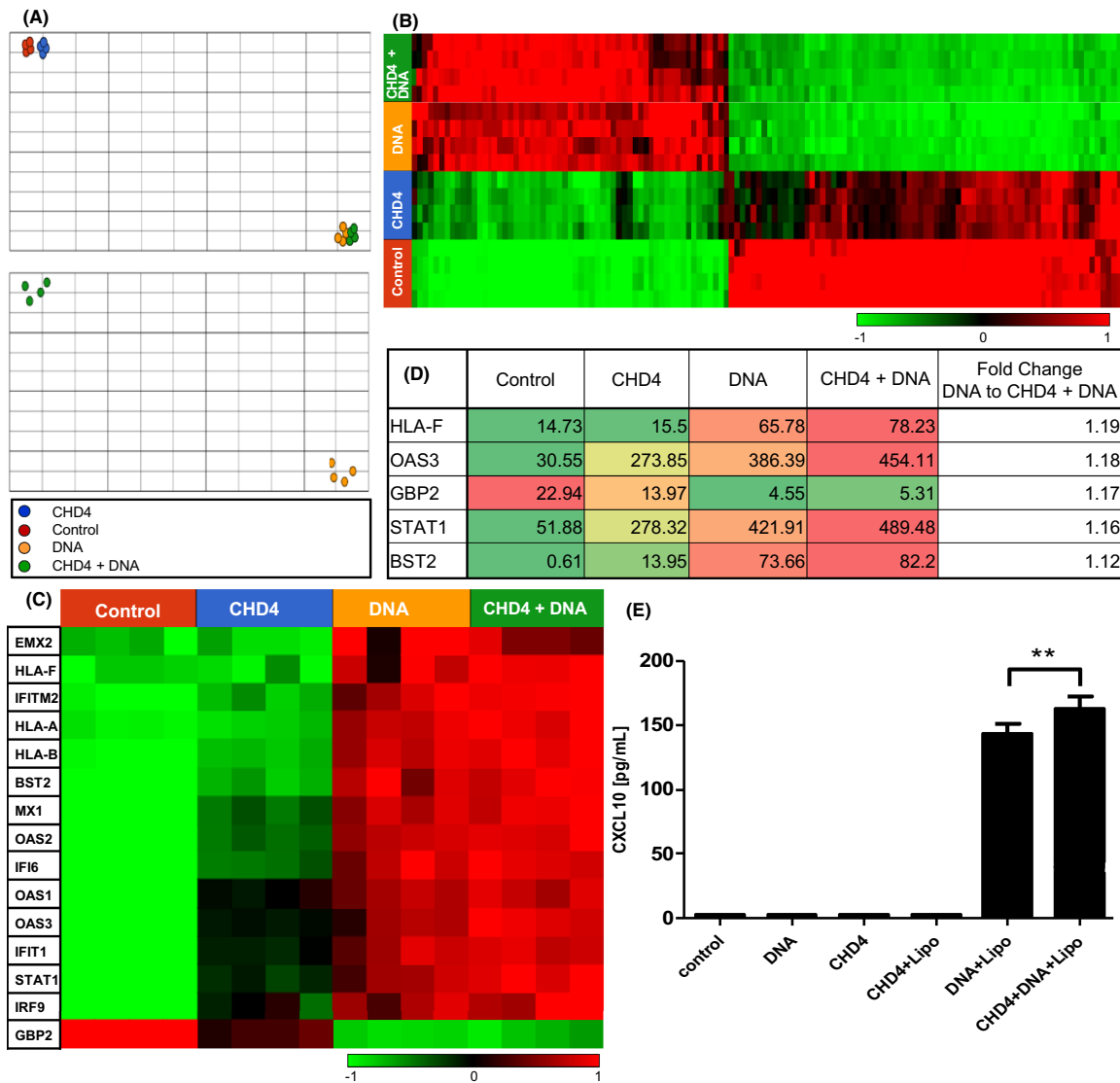
transfected with CHD4+DNA (Figure 3D) showed more cytosolic DNA/CHD4 complexes than the cells that were only transfected with Lipo and DNA+CHD4 (Figure 3C), but showed less cytosolic DNA/CHD4 complexes than the cells that were radiated, but not transfected (Figure 3B).

### 3.4 | Stimulation of HaCaTs with CHD4 and DNA leads to a higher activation of the type I Interferon signalling pathway activation than DNA alone

RNA isolated from HaCaTs that were stimulated with DNA, CHD4 and DNA+CHD4 with additional Lipo in all conditions was used for RNAseq. After the alignment, the relevant genes were filtered according to *p*-value and fold change. The list included 2130 different genes. In order to determine the distribution of the probes, we applied t-distributed stochastic neighbour embedding for filtered genes (t-SNE) which visualizes each treatment group as a cluster. The CHD4 treatment and control are clustered closely together, yet they represent two different entities (Figure 4A). Similarly, cells stimulated with DNA and DNA+CHD4 are situated in close proximity,

	Untreated (HC)	UV-treated	Transfected with DNA/CHD4	UV-treated and transfected with DNA/CHD4
	(A)	(B)	(C)	(D)
	Healthy/ Untreated	UV-treated	Unradiated + Transfected with DNA/CHD4	UV-treated + transfected with DNA/CHD4
Cytosolic DNA	(+)	+++	+	++
Cytosolic CHD4	(+)	+++	++	++
Cytosolic Complexes DNA/CHD4	0	+++	+	++
Cytosolic LIPO- DNA/CHD4 Particles	0	0	+++	+++

**FIGURE 3** Localization of CHD4 and DNA in HaCaTs under different conditions Representative immunofluorescent images of HaCaT cells stained with DAPI (blue) and anti-CHD4-antibody (green). Cytoplasmic DNA-motifs are stained with anti-DNA antibody (clone AC-30-10) represented in red colour. UV-treated cells were radiated at 150mj/cm<sup>2</sup>. Transfected cells were stimulated with 12.5 µg/mL DNA, 2.4 µg/mLCHD4 and 15 µg/mL Lipofectamine (Lipo). All samples were incubated for 4 h before fixation. (A). In untreated cells CHD4 is mostly in and around the nucleus (B). In UV-radiated cells, CHD4 and DNA are translocated into the cytoplasm and colocalize (C). In DNA+CHD4 transfected cells, cytosolic Lipo-DNA/CHD4-particles in addition to little translocated DNA/CHD4 can be seen (D). In DNA+CHD4 transfected and UV-radiated cells, cytosolic Lipo-DNA/CHD4-particles in addition to a moderate amount of cytoplasmic CHD4 and DNA can be observed.



**FIGURE 4** CHD4 enhances the activation of the Type-I IFN pathway and makes endogenous DNA more immunogenic. HaCaTs were treated with 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA (DNA), 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CHD4 (CHD4) or stimulated with 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA + 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CHD4 (DNA + CHD4) and were all transfected with 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Lipo. Genes were sorted according to  $p$ -value (control vs DNA)  $\leq 0.01$ ;  $p$ -value (control vs DNA + CHD4)  $\leq 0.01$ ;  $p$ -value (DNA + CHD4 vs DNA)  $\leq 0.89$ ; Fold change (control vs DNA)  $< -2$  or  $> 2$ ; Fold change (control vs DNA + CHD4)  $< -2$  or  $> 2$ ; Fold change (DNA + CHD4 vs. DNA)  $< -1.2$  or  $> 1.1$ . (A): t-distributed stochastic neighbour embedding for filtered genes. The upper t-SNE plot was constructed by using default options to settings above. The bottom t-SNE plot using default option to gene list only comparing DNA vs. DNA + CHD4, genes filtered by  $p$ -value  $\leq 0.05$  Fold change  $< -1.05$  or  $> 1.05$  (B): Differentially expressed genes of untreated HaCaTs and HaCaTs stimulated with CHD4, DNA and CHD4 and DNA. Hierarchical clustering generation a heatmap. (C + D): Hierarchical clustering and LS (Mean) of IFN-I inducible. Genes were sorted according to settings above. Showing the a heatmap and LS (Mean) RNA amount of 15 most upregulated IFN-inducible genes chosen from the IFN-pathway list GO:0060337 'type I interferon signaling pathway'. Genes are listed from highest to lowest fold change comparing DNA vs. DNA + CHD4. (E): Stimulation of HaCaTs with CHD4 and DNA leads to a higher CXCL10 production in HaCaTs than stimulation with DNA alone. HaCaT cells were stimulated to the conditions named above. The concentration of secreted CXCL10 was measured after 24 hours in the cell supernatant using sandwich ELISA. Cells only treated with proteinaceous CHD4 (CHD4) or DNA (DNA) without Lipo showed no increase in cytokine production, compared to the medium control just as cells transfected with CHD4 (CHD4 + Lipo). The keratinocyte transfected with DNA using Lipo (DNA + Lipo) showed a high increase of CXCL10 production compared to the medium control. Premixed CHD4 and DNA transfected with Lipo (CHD4 + DNA + Lipo) triggered a significantly increased production of CXCL10 compared to cells transfected with DNA alone (DNA + Lipo). Biological tests were done in quadruplets which each was measured in duplicates. Technical replicates ( $n=3$ ). Significance was tested using two-tailed Mann-Whitney U-test (\*\* =  $p < 0.01$ ).

but represent two different entities. An even more striking effect can be observed when only cells stimulated with DNA are compared to those treated with DNA + CHD4 which shows close clustering of our biological replicates and a distance between the two treatment groups.

To investigate the direction of the effects of gene expression, hierarchical clustering of those genes was performed, resulting in a heatmap (Figure 4B). The heatmap shows that numerous genes were upregulated after stimulation of HaCaTs with DNA or DNA + CHD4, while the same genes tend to be upregulated after stimulation with CHD4 alone, too. Other genes are downregulated after stimulation with DNA or DNA + CHD4. Again, the stimulation of HaCaTs with CHD4 alone has again a similar effect as the stimulation with endogenous DNA, but the fold changes are lower.

In the next step, we analysed the genes that were upregulated after stimulation with DNA according to their function. Therefore, we investigated the biological relevance of the filtered genes by using the Gene Ontology (GO) resource. GO-Enrichment analysis revealed that pathways of innate immune response and IFN-signalling are involved. We picked 'GO:0060337 type I interferon signaling pathway' and analysed whether the genes are upregulated or downregulated after CHD4 stimulation. All genes from the list show a higher expression after being stimulated with CHD4 and DNA together rather than DNA alone. Figure 4C shows a heat map of all genes in the list 'GO:0060337 type I interferon signalling pathway'. The least-square mean (LSMean) which is defined as the normalized gene counts per group of the top 5 most highly upregulated IFN-inducible genes (Figure 4D) shows that four out of five genes are also upregulated by stimulation with CHD4 alone.

To see changes on protein level, the amount of standard DM cytokine CXCL10 produced by HaCaTs was measured by sandwich ELISA. Cells treated with DNA and CHD4 without any transfecting agent show no higher concentration of CXCL10 in the supernatant than the medium control (Figure 4E). In HaCaTs that were transfected with Lipo and CHD4, no increase in CXCL10 concentration could be observed (Figure 4E). DNA transfection of keratinocytes leads to a high production of CXCL10. Interestingly, cells transfected with autoantigen CHD4 and DNA together produce a significantly higher amount of CXCL10 than cells transfected with DNA alone (Figure 4E).

## 4 | DISCUSSION

### 4.1 | CHD4 overexpression correlates with the IFN-signature in skin disease

In our study, we were able to show that CHD4 is upregulated in the three cutaneous autoimmune diseases DM, CDLE and LP. This result is in line with the hypothesis that autoantigens are upregulated under IFN-associated inflammatory conditions, as an IFN-signature is a hallmark not only of DM but also of LP and CDLE.<sup>8,21</sup> Therefore, CHD4 might play a role either in initiating, maintaining

or resolving the processes of chronic inflammation in skin diseases that histologically present with an interface dermatitis.

After CHD4 is upregulated, it is assumed that CHD4 is subsequently translocated into the cytoplasm, which can predominantly be observed in the DM, but also CDLE biopsies (Figure S1). This corresponds with the translocation of CHD4 under UV-light exposure, which is a widely accepted environmental factor that is accountable for the disease exacerbation in DM and CDLE, though not in LP.<sup>21,22,27-29</sup> The most prominent translocation of CHD4 is visible in DM skin which indicates an association of the CHD4 translocation to the pathogenesis of DM. Especially as cytoplasmic CHD4 cannot pursue its organic effect of transcriptional regulation, it is thinkable that cytoplasmic CHD4 might influence the inflammatory pathway in DM in another way. The mechanism of CHD4 translocation and its effects are discussed in the following.

### 4.2 | UV light triggers the translocation of CHD4 and the formation of cytosolic CHD4-DNA complexes

The results show that CHD4 is able to bind endogenous DNA at very little concentrations, meaning with a very high affinity. Tight binding of CHD4 to DNA and the formation of complexes can be concluded by the shape of the sensogram that shows only very little dissociation of DNA-CHD4 binding over time (Figure 2A). This high affinity binding is a requirement for the formation of complexes in the cytoplasm of cells, which we observed using fluorescence microscopy.

HaCaTs that were radiated showed a translocation of CHD4 and DNA from the nucleus and the formation of cytoplasmic complexes. UV radiation is able to trigger skin lesions in patients with LE and can also trigger erythematous rash in DM patients and can hence influence the development of DM and Mi-2 autoimmunity.<sup>8,23,30</sup> Additionally, reports describe potential mechanisms of UV radiation on immunosuppression and promotion of autoimmunity, by inducing a type I interferon signature and other immune networks affecting the pathogenesis of DM. These include alterations in stress proteins, interleukin-1, Interleukin-6, tumour necrosis factor  $\alpha$ , NF- $\kappa$ B and adhesion molecule pathways.<sup>31,32</sup>

Our finding that Mi-2 protein CHD4 is localized in the nucleus of mammalian cells and the upregulation and translocation of autoantigens in keratinocytes after UV-radiation has previously been described in scientific publications.<sup>13,33</sup> Studies have reported that following UV-radiation, CHD4 levels in a human keratinocyte cell line are rapidly upregulated and maintained due to a higher translational efficiency through a regulatory element in the 5'-UTR region of mRNA and also by increased protein stability.<sup>23,34</sup> Since aAb to other members of the NuRD complex have not been reported in idiopathic inflammatory myopathies and UV-radiation does not significantly affect other NuRD proteins, Mi-2 appears to act independently of those in response to DNA damage.<sup>23</sup>

Since UVB is a well-known environmental factor capable of inducing apoptosis in vitro and in vivo, it raises the question to how

the noninflammatory milieu accompanying most apoptosis can provoke an immunogenic response leading to inflammation and aAb formation.<sup>33,35</sup> Studies found that the process of cell death could be a possible source for SLE and DM autoantigens.<sup>33,36,37</sup> Caricchio et al describe that the exact amount of UV exposure is crucial in determining the amount of inflammatory cytokine production and the degree of autoantigen translocation in keratinocytes.<sup>33</sup> They found that intermediate doses of UV-B (35 mJ/cm<sup>2</sup>) cause apoptosis with altered morphology, slower DNA fragmentation and poly (ADP-ribose) polymerase degradation accompanied by increased Bcl-2, whereas high doses of UVB (80 mJ/cm<sup>2</sup>) were found to induce necrosis.<sup>33</sup> Similar effects were seen for nuclear antigens where in intermediate doses, autoantigens like Sm and Ku concentrated on the cell membrane when the nucleus was still visible. At high doses, these autoantigens diffused into the cytoplasm and were then released into the supernatant.<sup>33</sup> Additionally a new study shows the possible translocation of nuclear autoantigen, SSB/La protein, to the cytoplasm, triggered in a ligand/receptor-dependent manner under physiological conditions.<sup>38</sup>

The formation of complexes containing translocated autoantigen CHD4 and DNA *in vivo* is a newly described mechanism. We expected an immune stimulatory effect of those complexes, as liposomes containing CHD4-DNA complexes lead to further translocation of CHD4 and DNA in non-radiated, which could be seen as smaller speckled complexes (Figure 3C). High affinity and tight binding of CHD4 to DNA is a necessity to form complexes *in vivo*, for example in pre-apoptotic cells. Those complexes could then lead to effects in the cells they are formed in or under certain circumstances in their surrounding cells. If small amounts of DNA/CHD4 complexes enter the cell via microvesicles, due to impaired phagocytosis or through pre-damaged cells, the complexes can have immune stimulatory effects such as the further upregulation of CHD4 and translocation of endogenous DNA. Microvesicles are small vesicles that originate during apoptosis or activation that can contain nucleic acids and various components from their parental cells.<sup>39</sup> The absorbed complexes could then contribute to chronic inflammatory vicious cycle in DM autoimmunity when ingested by a cell, by repeatedly activating the innate immune system.

#### 4.3 | UV light triggers the formation of anti-Mi-2 autoantibodies

Anti-Mi-2 aAb are highly specific to DM and strongly correlate with disease activity, with anti-Mi-2 aAb levels even normalizing as the disease becomes less active.<sup>11-13</sup> A multicentre study by Okada et al showed that terrestrial surface UV radiation intensity contributes to the relative prevalence of DM and was also strongly related to the proportion of anti-Mi-2 aAb.<sup>40</sup> This results in the prevalence of DM increasing significantly with geographical latitude, going from northern Europe to southern Europe and similarly in the United States.<sup>21,41</sup> The prevalence of Mi-2 aAb is higher at lower latitudes as well. While 60% of DM patients in Guatemala City present with

anti-Mi-2 aAb, in Montreal only a mere 3% of DM patients are anti-Mi-2 aAb positive.<sup>40,42</sup> In those studies, an increased surface UV radiation intensity was the single variable identified that increased the odds of developing an immune response against Mi-2.<sup>21,40,42</sup> Most importantly, there was no significant association between UV radiation intensity and the proportion DM patients with antisynthetase aAb or anti-SRP aAb, or those patients without any myositis-specific aAb.<sup>21</sup> This indicates that anti-Mi-2 aAb-positive DM is related to UV exposure closer than DM related to other myositis-specific aAb like antisynthetase or anti-SRP aAb.<sup>21</sup> Yet, a study comparing photosensitivity showed similar results between DM and LE. CDLE appeared to be more photosensitive than SCLÉ and hence showed almost identical results to DM regarding the minimal erythema dose.<sup>28</sup> In summary, there is both a logical and a statistical association between UV radiation and Anti-Mi-2 aAb positive DM. Although similar mechanisms might play a role in CDLE, we cannot explain at present why CDLE patients do not lead to anti-Mi-2 aAb production.

#### 4.4 | Implications of type I IFNs on the chronic inflammatory cycle in DM

The activation of the innate immune system with high expression of IFNs and IFN-regulated proteins is seen as an important pathological hallmark of DM.<sup>8</sup> By the inappropriate activation of the innate immune system followed by a secondary dysregulation of the adaptive immune response, a central feature of the pathogenesis of DM can be described.<sup>8</sup>

As type I IFNs have a very short half-life, gene expression analysis and IFN-regulated proteins provide more suitable biomarkers in daily practice. Those include the type I IFN-regulated pro-inflammatory chemokine CXCL10 which is elevated in DM skin lesions.<sup>8</sup> Chemokines like CXCL9 and CXCL10 can be found in dermis and epidermis of DM lesions. Therefore, CXCL10 is a very suitable marker for inflammation in keratinocytes. CXCL10 is also a surrogate marker for IFN I directed inflammation and was previously used in multiple studies as a reliable marker.<sup>43-45</sup> For this reason, we measured the amount of CXCL10 protein from transfected keratinocytes, which showed that CHD4 also enhances the amount of functional protein produced by HaCaTs transfected with DNA.

As seen in the t-SNE, the cells transfected with CHD4 were clustered separately from the control. The same applies for the clusters stimulated additionally with CHD4 in comparison with DNA alone. The presence of separated clusters shows that CHD4 does in fact alter the gene expression profile of HaCaTs. So both the stimulation with CHD4 alone and CHD4 in addition to DNA have an effect on the gene expression of keratinocytes. For most genes, the effect of CHD4 appears concordant with the effect of DNA. Both DNA and CHD4 individually enhance crucial genetic pathways of the innate immune system such as the type I IFN signalling. Most importantly, stimulation of HaCaTs with CHD4 in addition to DNA leads to an upregulation of IFN-regulated genes up to 19%. This is crucial, because this process takes place in target tissue, namely keratinocytes,

indicating a bulk effect that suggests the relevance of keratinocytes as cells of our innate immune system.

Additionally, the acquisition of adjuvant activity by autoantigens could play a role in vivo. Previous research revealed that, after the self-antigens are released to the extracellular space, they can undergo post-apoptotic modifications, which may make them more immunogenic.<sup>33,46</sup> Myositis antigens are susceptible to cleavage mediated by granzyme B, secreted by cytotoxic lymphocytes and CD28–T cells. The generation of novel antigens can then trigger the positive selection of autoreactive T-cell and B-cell clones.<sup>11</sup> In response, the newly created cryptic epitopes could be presented on the surface of antigen-presenting cells by class I or II major histocompatibility complex (MHC), escaping immunological tolerance and generating autoimmune responses.<sup>11,15,16</sup> Finally, the impaired clearance of apoptotic debris may also contribute to the process of self-immunization.<sup>33</sup> Therefore, the effect of CHD4 could even be more drastic than described.

The physiological functions of nuclear CHD4 include to act as a transcriptional regulator controlling epidermal homeostasis.<sup>19,20</sup> The function of highly upregulated, translocated or modified CHD4 has to be distinguished from that. Cytoplasmic CHD4, preserving the ability to bind DNA, cannot pursue its function of transcriptional regulation in its organic way. In our study, we found that CHD4 is translocated to the cytoplasm and binds endogenous DNA with a very high affinity and forms cytoplasmic complexes that enhance the expression of type I IFN-regulated genes. Therefore, the function of nuclear CHD4 protecting genome integrity might contribute to an amplification loop in autoimmunity, in which tissue damage and healing provide fuel for further immune responses, as they lead to damage-induced enhancement of autoantigen expression and the obtaining of adjuvant activity.<sup>16</sup>

Taken together, CHD4 binds endogenous DNA with a very high affinity and forms cytoplasmic complexes after UV radiation. Those CHD4+DNA enhance the expression of type I IFN-regulated genes more than DNA alone. Additionally, the expression of CXCL10 cytokine is also significantly higher when HaCaTs were stimulated with CHD4 in addition to DNA treatment. This shows that CHD4 can indeed increase the immune stimulatory capacity of endogenous DNA. The immune complexes containing CHD4 and DNA can arise because of environmental triggers like UV-light or cell damage induced by dysregulation of the adaptive immune system. This is supported by the fact that autoantigens like CHD4 are upregulated and translocated under IFN-associated inflammatory conditions. These immune complexes can then accelerate the spiral of disease progression in activating the innate immune system and once again leading to the further activation of the adaptive immune system with amplified tissue damage. Considering autoantigens in keratinocytes as a possible trigger for the sustainment of the chronic autoimmune mediated inflammation in DM could further a deeper understanding of mechanisms in DM.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

TG planned and performed the experimental work. JS and GM helped planning and performing surface plasmon resonance analysis. BS

assisted in histological staining, JW involved in histological analysis. JW, TF and TB contributed to writing and editing the manuscript.

#### ACKNOWLEDGEMENT

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### REFERENCES

- DeWane ME, Waldman R, Lu J. Dermatomyositis: clinical features and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*. 2020;82(2):267-281. doi:10.1016/j.jaad.2019.06.1309
- Bogdanov I, Kazandjieva J, Darlenski R, Tsankov N. Dermatomyositis: current concepts. *Clin Dermatol*. 2018;36(4):450-458. doi:10.1016/j.clindermatol.2018.04.003
- Bendewald MJ, Wetter DA, Li X, Davis MDP. Incidence of dermatomyositis and clinically amyopathic dermatomyositis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Arch Dermatol*. 2010;146(1):26-30. doi:10.1001/archdermatol.2009.328
- Dalakas MC. Inflammatory muscle diseases. *N Engl J Med*. 2015;372(18):1734-1747. doi:10.1056/NEJMra1402225
- Jorizzo JL. Dermatomyositis. *Arch Dermatol*. 2002;138(1):114-116. doi:10.1001/archderm.138.1.114
- Bolognia JL. *Dermatology*. 4th ed. Elsevier Saunders; 2017.
- Swafford C, Roach ES. Juvenile dermatomyositis and the inflammatory myopathies. *Semin Neurol*. 2020;40(3):342-348. doi:10.1055/s-0040-1705120
- Hornung T, Wenzel J. Innate immune-response mechanisms in dermatomyositis: an update on pathogenesis, diagnosis and treatment. *Drugs*. 2014;74(9):981-998. doi:10.1007/s40265-014-0240-6
- Cruellas MG, Viana VS, Levy-Neto M, Souza FH, Shinjo SK. Myositis-specific and myositis-associated autoantibody profiles and their clinical associations in a large series of patients with polymyositis and dermatomyositis. *Clinics*. 2013;68(7):909-914. doi:10.6061/clinics/2013(07)04
- Burbelo PD, Iadarola MJ, Alevizos I, Sapio MR. Transcriptomic segregation of human autoantigens useful for the diagnosis of autoimmune diseases. *Mol Diagn Ther*. 2016;20(5):415-427. doi:10.1007/s40291-016-0211-6
- Thompson C, Piguat V, Choy E. The pathogenesis of dermatomyositis. *Br J Dermatol*. 2018;179(6):1256-1262. doi:10.1111/bjd.15607
- Pinal-Fernandez I, Mecoli CA, Casal-Dominguez M, et al. More prominent muscle involvement in patients with dermatomyositis with anti-Mi2 autoantibodies. *Neurology*. 2019;93(19):e1768-e1777. doi:10.1212/WNL.0000000000008443
- Ghirardello A, Bassi N, Palma L, et al. Autoantibodies in polymyositis and dermatomyositis. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(6):335. doi:10.1007/s11926-013-0335-1
- Stuhlmüller B, Schneider U, González-González J-B, Feist E. Disease specific autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies. *Front Neurol*. 2019;10:438. doi:10.3389/fneur.2019.00438
- Marzęcka M, Niemczyk A, Rudnicka L. Autoantibody markers of increased risk of malignancy in patients with dermatomyositis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2022;63:289-296. doi:10.1007/s12016-022-08922-4
- Suber TL, Casciola-Rosen L, Rosen A. Mechanisms of disease: autoantigens as clues to the pathogenesis of myositis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(4):201-209. doi:10.1038/ncprheum0760



17. Williams CJ, Naito T, Arco PG-D, et al. The chromatin remodeler mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development. *Immunity*. 2004;20(6):719-733. doi:10.1016/j.immuni.2004.05.005
18. Yen W-F, Sharma R, Cols M, et al. Distinct requirements of CHD4 during B cell development and antibody response. *Cell Rep*. 2019;27(5):1472-1486.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.04.011
19. Kashiwagi M, Hosoi J, Lai J-F, et al. Direct control of regulatory T cells by keratinocytes. *Nat Immunol*. 2017;18(3):334-343. doi:10.1038/ni.3661
20. Shibata S, Kashiwagi M, Morgan BA, Georgopoulos K. Functional interactions between mi-2 $\beta$  and AP1 complexes control response and recovery from skin barrier disruption. *J Exp Med*. 2020;217(3):e20182402. doi:10.1084/jem.20182402
21. Love LA, Weinberg CR, McConaughy DR, et al. Ultraviolet radiation intensity predicts the relative distribution of dermatomyositis and anti-Mi-2 autoantibodies in women. *Arthritis Rheum*. 2009;60(8):2499-2504. doi:10.1002/art.24702
22. Artuković M, Ikić M, Kustelega J, Artuković IN, Kaliterna DM. Influence of UV radiation on immunological system and occurrence of autoimmune diseases. *Coll Antropol*. 2010;34:175-178.
23. Betteridge ZE, Gunawardena H, McHugh NJ. Pathogenic mechanisms of disease in myositis: autoantigens as clues. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21(6):604-609. doi:10.1097/BOR.0b013e328331638a
24. Fornaro M, Girolamo F, Cavagna L, et al. Severe muscle damage with myofiber necrosis and macrophage infiltrates characterize anti-Mi2 positive dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)*. 2021;60(6):2916-2926. doi:10.1093/rheumatology/keaa739
25. Casciola-Rosen L, Nagaraju K, Plotz P, et al. Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *J Exp Med*. 2005;201(4):591-601. doi:10.1084/jem.20041367
26. Wenzel J, Wörenkämper E, Freutel S, et al. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol*. 2005;205(4):435-442. doi:10.1002/path.1721
27. Pavlotsky F, Nathansohn N, Kriger G, Shpiro D, Trau H. Ultraviolet-B treatment for cutaneous lichen planus: our experience with 50 patients. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2008;24(2):83-86. doi:10.1111/j.1600-0781.2008.00344.x
28. Dourmishev L, Meffert H, Piazena H. Dermatomyositis: comparative studies of cutaneous photosensitivity in lupus erythematosus and normal subjects. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2004;20(5):230-234. doi:10.1111/j.1600-0781.2004.00115.x
29. Furukawa F, Muto M. Ethnic differences in immunogenetic features and photosensitivity of cutaneous lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(1):111-115. doi:10.1007/s00403-008-0897-3
30. Kuhn A, Beissert S. Photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2005;38(7):519-529. doi:10.1080/08916930500285626
31. Grundtman C, Lundberg IE. Pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep*. 2006;8(3):188-195. doi:10.1007/s11926-996-0024-4
32. Murphy GM. Ultraviolet radiation and its effects on the immune system. *Clin Exp Dermatol*. 2000;25(2):162-163. doi:10.1046/j.1365-2230.2000.0604k.x
33. Caricchio R, McPhie L, Cohen PL. Ultraviolet B radiation-induced cell death: critical role of ultraviolet dose in inflammation and lupus autoantigen redistribution. *J Immunol*. 2003;171(11):5778-5786.
34. Burd CJ, Kinyamu HK, Miller FW, Archer TK. UV radiation regulates Mi-2 through protein translation and stability. *J Biol Chem*. 2008;283(50):34976-34982. doi:10.1074/jbc.m805383200
35. Plotz PH. The autoantibody repertoire: searching for order. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):73-78. doi:10.1038/nri976
36. Utz PJ, Hottelet M, Schur PH, Anderson P. Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 1997;185(5):843-854. doi:10.1084/jem.185.5.843
37. Casciola-Rosen L, Rosen A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus*. 1997;6(2):175-180. doi:10.1177/096120339700600213
38. Berndt N, Bippes CC, Michalk I, et al. And yet it moves: oxidation of the nuclear autoantigen La/SS-B is the driving force for Nucleo-cytoplasmic shuttling. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18):9699. doi:10.3390/ijms22189699
39. Chen Y, Li G, Liu M-L. Microvesicles as emerging biomarkers and therapeutic targets in cardiometabolic diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2018;16:50-62. doi:10.1016/j.gpb.2017.03.006
40. Okada S, Weatherhead E, Targoff IN, Wesley R, Miller FW. Global surface ultraviolet radiation intensity may modulate the clinical and immunologic expression of autoimmune muscle disease. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2285-2293. doi:10.1002/art.11090
41. Hengstman GJ, van Venrooij WJ, Vencovsky J, Moutsopoulos HM, van Engelen BG. The relative prevalence of dermatomyositis and polymyositis in Europe exhibits a latitudinal gradient. *Ann Rheum Dis*. 2000;59(2):141-142. doi:10.1136/ard.59.2.141
42. Mammen AL. Dermatomyositis and polymyositis: clinical presentation, autoantibodies, and pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1184:134-153. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05119.x
43. Scholtissek B, Zahn S, Maier J, et al. Immunostimulatory endogenous nucleic acids drive the Lesional inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol*. 2017;137(7):1484-1492. doi:10.1016/j.jid.2017.03.018
44. Klaeschen AS, Wenzel J. Upcoming therapeutic targets in cutaneous lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2016;9(4):567-578. doi:10.1586/17512433.2016.1145543
45. Wenzel J, Zahn S, Tüting T. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus: common and different features in distinct subsets. *Lupus*. 2010;19(9):1020-1028. doi:10.1177/0961203310370046
46. Targoff IN. Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*. 2000;12(6):475-481. doi:10.1097/0002281-200011000-00001

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**Figure S1:** Autoantigen CHD4 is significantly upregulated in the three AI-CTDs; DM, CDLE and LP as well as translocated in DM and CDLE Immunohistologic micrographs showing the expression of CHD4 in different skin diseases: dermatomyositis (DM), chronic discoid lupus erythematosus (CDLE), lichen planus (LP), psoriasis (Pso), atopic dermatitis (AD) and healthy control (HC) (n = 5 for each subset). Original magnification:  $\times 200$ .

**How to cite this article:** Guel T, Scholtissek B, Siegl J, et al. Dermatomyositis autoantigen CHD4 forms immune stimulatory complexes with endogenous DNA. *Exp Dermatol*. 2023;32:965-974. doi:10.1111/exd.14799

### 3. Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Prof. Dr. Joerg Wenzel, meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Über die Jahre hinweg hat er meine Forschungsinteressen immer unterstützt und mir eine hervorragende Betreuung zuteilwerden lassen. Sein Vertrauen in seine Doktoranden hat es mir ermöglicht, an mehreren wissenschaftlichen Kongressen und Fortbildungen teilzunehmen, eine prä-klinische Studie zu begleiten und meine Forschungsideen erfolgreich umzusetzen.

Ich bin auch Prof. Dr. Mayer dankbar dafür, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat, in seinem Labor zu arbeiten und den Biacore 3000 für meine SPR-Studien zu nutzen. Frau Dr. Julia Siegl unterstützte mich freundlicherweise bei meiner Arbeit am Biacore 3000 und hat mich angeleitet.

Ein besonderer Dank geht an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe, insbesondere an Sandra Ferring-Schmitt, Malgorzata Woyciechowska, Nadine van Holt und Tanja Fetter, die mich durch ihre täglichen Gespräche und Ermutigungen unterstützt haben. Es war eine Freude, mit Dennis Niebel und Luka de Voss an der Erforschung der Immuninfiltration bei Lupus erythematodes zusammenzuarbeiten. Bei Benedikt Scholtissek bedanke ich mich für seine inspirierende vorherige Forschung und seine motivierenden Worte während meiner gesamten Arbeit an der Dissertation.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während dieses Lebensabschnitts immer motiviert haben.