

## Abteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie

### ■ Leiter: Prof. Dr. Thomas Werfel

Tel.: 0511 / 532-5092 • E-Mail: werfel.thomas@mh-hannover.de • www.mh-hannover.de/dermatologie.html

### Forschungsprofil

Der wissenschaftliche Schwerpunkt der Forschungsabteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie liegt in der Untersuchung von allergischen Erkrankungen mit Manifestationen an der Haut, von chronisch entzündlichen Hautkrankheiten und von Autoimmunerkrankungen der Haut. In den Projekten der Forschungsabteilung stehen Untersuchungen zu Ekzemkrankheiten (atopische Dermatitis, allergisches Kontaktekzem) und zur Psoriasis derzeit im Mittelpunkt der meisten Untersuchungen. Die Forschungsabteilung wurde im April 2008 innerhalb der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der MHH gegründet. Ihre laufenden Projekte sind naturgemäß thematisch mit der Klinik eng vernetzt, sowohl in Bezug auf die grundlagenorientierten Forschungsprojekte, die zum größeren Teil von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Normalverfahren, der Klinischen Forschergruppe 250 „Autoimmunität“, im Sonderforschungsbereich 566 und im DFG-Graduiertenkolleg „Regulation der allergischen Entzündung in Lunge und Haut“ gefördert werden, als auch in Bezug auf die klinisch-wissenschaftlichen Projekte. In diesem Forschungsbericht wird eine ausgewählte Thematik dargestellt und eine Auswahl von weiteren Projekten, die im Fokus der Forschungsabteilung stehen, aufgelistet. Um Redundanzen zu vermeiden, wird bei den Publikationen ansonsten auf den Bericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie verwiesen.

### Forschungsprojekte

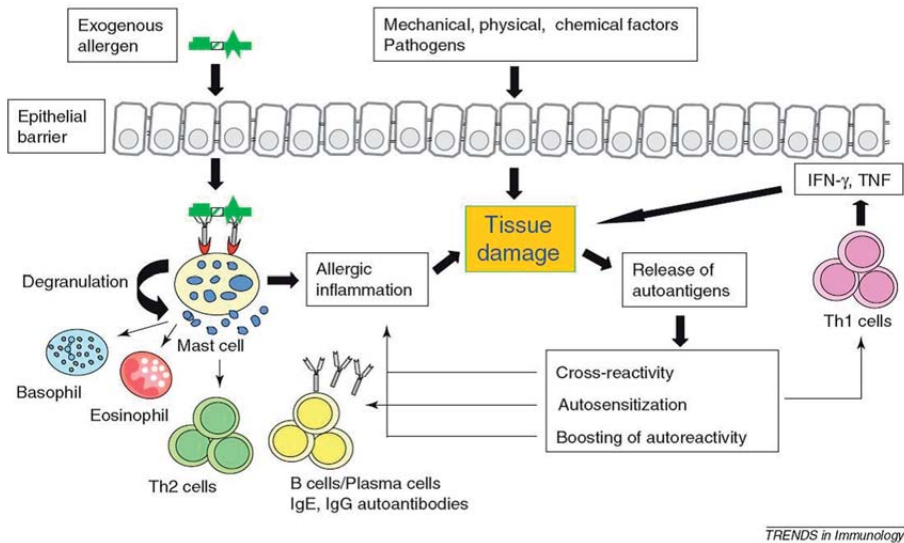
#### **Forschungsschwerpunkt: Autoimmunität bei atopischer Dermatitis**

Der Krankheitsverlauf der atopischen Dermatitis (AD) ist chronisch-schubhaft. Obwohl zahlreiche Triggerfaktoren dieser Erkrankung bereits identifiziert werden konnten, ist diese chronisch-entzündliche Hauterkrankung bislang nicht heilbar.

Ungefähr 80% der erwachsenen Patienten mit AD haben Sensibilisierungen gegenüber saisonalen sowie perennialen Aeroallergenen und/oder Lebensmittelallergenen, die mit allergenspezifischen IgE, positiven Prick-Test- und positiven Atopie-Patch-Testreaktionen assoziiert sind. In entsprechend sensibilisierten Patienten mit AD können diese Allergene über respiratorische, orale sowie kutane Exposition sowohl allergische Reaktionen vom Soforttyp hervorrufen als auch zu einer Spättypreaktion mit Hautverschlechterung führen.

Eine Untergruppe an Patienten mit AD zeigt eine IgE-Reaktivität gegen humane Antigene, die zudem auch mit der Krankheitsschwere assoziiert ist. Die Expression dieser Autoallergene wurde in verschiedenen Zelltypen beobachtet.

Zum einen konnten bei Patienten mit AD spezifische IgE-Antikörper auf humane Antigene (Hom s 1- s 5) nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Entwicklung einer Sensibilisierung gegen diese Antigene wird postuliert, dass es durch einen beispielsweise mechanischen Reiz wie durch Kratzen zur Freisetzung von epithelialen Antigenen/ Autoallergenen und in der Folge zur Sensibilisierung kommt



TRENDS in Immunology

**Abb. 1:** Mechanismen zur Entwicklung einer Autoimmunität bei AD (aus: Valenta R, Mittermann I, Werfel T et al. Linking allergy to autoimmune disease. Trends Immunol 2009;30:109-16)

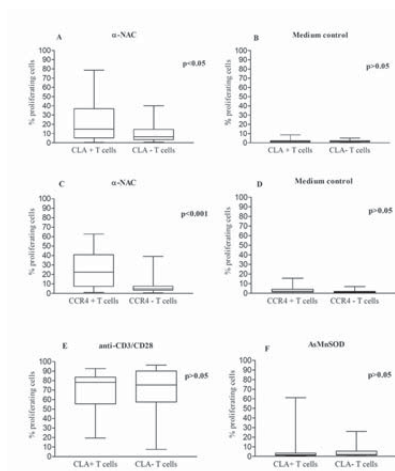
Zum anderen gibt es Hinweise für eine „Autoallergie“ infolge eines molekularen Mimikry. Zugrunde liegt hier eine Sensibilisierung gegen ein Umgebungsallergen, welche basierend auf einer Kreuzreaktivität auch zu einer Sensibilisierung gegen ein korrespondierendes humanes Protein führt.

In Zellkulturüberständen gelang uns der Nachweis der zwei humanen „Autoallergene“ Hom s 2 ( -NAC) und Thioredoxin (Trx) nach Stimulation von humanen Keratinozyten, was ein möglicher Hinweis dafür ist, dass diese Proteine in der Epidermis entzündeter Haut T-Zellen zugänglich sind. T-Zellen sind bei der AD nicht nur an der IgE-Regulation in lymphatischen Organen beteiligt, sondern dominieren auch das Zellinfiltrat in läsionaler Haut und spielen daher für den Krankheitsverlauf der AD eine kritische Rolle.

Hauptziel in diesem Forschungsprojekt ist die Klärung der Frage, welche Rolle autoreaktive T-Zellen bei verschiedenen Varianten der AD haben. Hierfür untersuchen wir in zwei Teilprojekten die Relevanz i.) des Atopie-assoziierten Antigens (A-Ag) Hom s 2 ( -NAC) ohne bekannte Kreuzreaktivität zu Umweltallergenen (Kooperation mit Prof. R. Valenta, Wien) und ii.) einer Kreuzreaktivität zwischen dem Antigen Thioredoxin aus hautkolonisierendem Malassezia sympodialis (Mala s 13) und dem korrespondierenden humanen Antigen Thioredoxin (hTrx). (Kooperation mit Prof. R. Cramer, Davos, und Prof. A. Scheynius, Stockholm).

**i.)** Die alpha-Kette des „nascent polypeptide-associated complex“ ( -NAC, Hom s 2) war als ein humanes Antigen mit IgE-Autoreaktivität bereits identifiziert worden. Es handelt sich hierbei um die Komponente eines intrazellulär lokalisierten heterodimeren Komplexes mit der Funktion eines Transkriptions-Kofaktors. -NAC ist als Induktor von IFN-γ beschrieben, das in der chronischen Phase der AD in der Haut überexprimiert ist. Zur Untersuchung der Rolle autoreaktiver spezifischer T-Lymphozyten wurde mittels Lymphozytenproliferationsassays die spezifische Proliferation auf -NAC bei 30 AD Patienten und 12 gesunden Kontrollpersonen anhand der Durchflusszytometrie analysiert. Die spezifische Proliferation von T-Zellen aus peripherem Blut und läsionaler Haut wurde außerdem mittels „Limiting-dilution“ Kulturen erfasst. T-Zellklone wurden aus Blut und läsionaler Haut von AD-Patienten und Psoriasis-Patienten generiert und hinsichtlich ihrer Antigenspezifität, ihres Phänotyps und Zytokinmusters charakterisiert.

Für CLA+ und CCR4+ T-Lymphozyten ist für die ein so genanntes „skin-homing“ mit vornehmlicher Infiltration in die Haut bei AD-Patienten beschrieben. In unseren Untersuchungen induzierte  $\alpha$ -NAC eine signifikant höhere Proliferation von CCR4+ (im Vergleich zu CCR4-) und von CLA+ (im Vergleich zu CLA-) T-Lymphozyten aus peripherem Blut.



**Abb. 2:** Messung der Proliferation von PBMC bei AD-Patienten (n=30) mittels CFSE. Nach Stimulation mit  $\alpha$ -NAC ließ sich eine signifikant erhöhte Proliferation der CLA+ und CCR4+ T Lymphozyten im Vergleich zum CLA- bzw. CCR4- Kompartiment beobachten (a,c). Dieser Effekt ließ sich weder in den Mediumkontrollen (b,d) noch nach Stimulation mit anti-CD3/CD28 (Positivkontrolle) oder mit der Aspergillus Mangansuperoxiddismutase, für welche ebenfalls eine spezifische T-Zell-Antwort bei einer Untergruppe an AD-Patienten beschrieben ist, nachweisen. (aus: Heratizadeh A et al. The role of T cell reactivity towards the autoantigen  $\alpha$ -NAC in atopic dermatitis. Br J Dermatol 2011;164:316-324)

In den Limiting-dilution Kulturen führte  $\alpha$ -NAC zu einer erhöhten Proliferation sowohl der Blut- als auch der Hautlymphozyten im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Darüber hinaus konnten insgesamt mehr als 100  $\alpha$ -NAC-spezifische T-Zellklone aus Blut (60,7% CD8+ und 39,3% CD4+) und lässionaler Haut (10% CD8+ und 90% CD4+) von AD-Patienten generiert werden. Diese  $\alpha$ -NAC-spezifischen T-Zellklone produzierten nicht nur TH2-, sondern auch TH1-Zytokine. Aus dem Blut einer gesunden Kontrollperson sowie aus dem Blut von Psoriasis-Patienten ließen sich dagegen keine und aus lässionaler Haut von Psoriasis-Patienten nur ein spezifischer T-Zellklon generieren.

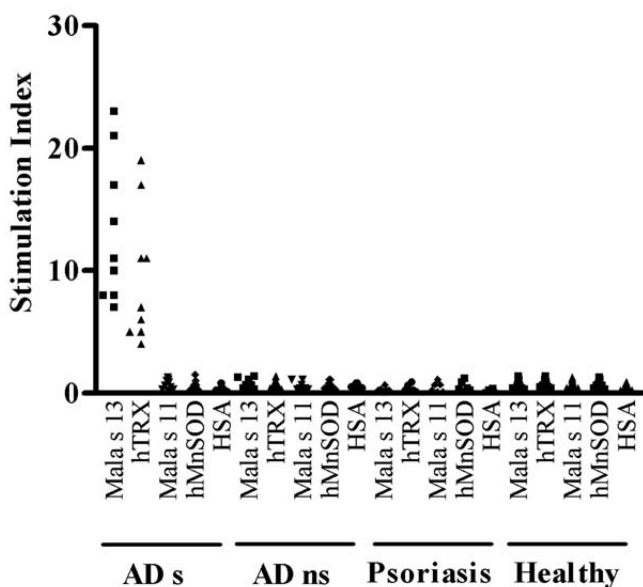
Zusammenfassend konnte anhand unserer Untersuchungen bestätigt werden, dass  $\alpha$ -NAC als ein humanes Autoallergen bei AD von Relevanz ist. Insbesondere aber konnten wir erstmals eine T-Zell-vermittelte Immunantwort gegenüber  $\alpha$ -NAC mit spezifischer Proliferation von vornehmlich „skin-homing“ T-Zellen nachweisen. Die aus lässionaler Haut generierten  $\alpha$ -NAC-spezifischen T-Zellklone produzierten vornehmlich IFN- $\gamma$ . Diese Beobachtung könnte außerdem den TH1-Phänotyp bei chronischer AD erklären.

Im weiteren Projektverlauf sollen die Mechanismen der Antigenpräsentation (auch Kreuzpräsentation) mittels Herstellung von MHC Tetrameren verbunden mit der Charakterisierung immundominanter Regionen von Autoantigenen untersucht werden. Hierzu gehört auch die genauere Phänotypisierung und Funktionsbestimmung der Zellen (Chemokin- und Zytokinmuster, Zytotoxizität gegenüber Autoantigen beladenen Zellen).

**ii.)** Der Nachweis einer IgE-vermittelten Sensibilisierung gegen Antigene von hautkolonisierenden *Malassezia* Spezies wurde als spezifisch für Patienten mit einer AD beschrieben. Die als Redox-Proteine fungierenden Thioredoxine aus *Malassezia* Spezies gehören zu einer Klasse von Pan-Allergenen. Auf der Basis eines molekularen Mimikry konnte bereits für Thioredoxin aus *Malassezia sympodialis* (Mala s 13) eine Kreuzreaktivität mit dem humanen korrespondierenden Antigen hTrx nachgewiesen werden. Im Fokus dieses Teilprojekts steht die Untersuchung der Relevanz einer Kreuzreaktivität zwischen Mala s 13 und hTrx auf Ebene der T-Zellen bei Patienten mit einer AD.

Aus peripherem Blut und aus positiven Epikutan-Test-Reaktionen auf *Malassezia*-Antigene bei AD-Patienten mit IgE-Sensibilisierung gegen Mala s 13 und hTrx wurden T-Zellen isoliert. In Gegenwart von rMala s 13 wurden dann T-Zelllinien und weiterführend T-Zellklone generiert. Es folgte die Charakterisierung der Mala s 13-spezifischen T-Zellklone hinsichtlich ihrer Antigenspezifität, ihres Phänotyps und ihres Zytokinmusters. Des Weiteren wurden humane Keratinozyten

wurden mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-4 stimuliert und die Freisetzung von hTrx in den Kulturüberständen mittels ELISA erfasst. Es zeigte sich, dass die Mala s 13-spezifischen T-Zelllinien und T-Zellklone aus Blut und Haut von (Mala s 13 und hTrx-sensibilisierten) AD-Patienten vollständig kreuzreaktiv mit hTrx waren. Dieses Phänomen scheint spezifisch für die AD zu sein, da sich Mala s 13-, hTrx-spezifische T-Zellklone weder aus dem Blut nicht-sensibilisierter AD-Patienten noch aus dem Blut von Psoriasis-Patienten und gesunder Kontrollen generieren ließen.



**Abb. 3:** T-Zelllinien von AD-Patienten, welche in Anwesenheit von Mala s 13 generiert wurden, proliferieren in Gegenwart von Mala s 13 und hTrx. In Gegenwart von Mala s 13 aus peripherem Blut von IgE-sensibilisierten AD-Patienten („AD s“), nicht-sensibilisierten AD-Patienten („AD ns“), Psoriasis-Patienten und gesunden Kontrollen generierte T-Zelllinien wurden mit rMala s 13, rhTrx, außerdem mit zwei weiteren Autoantigenen aus Malassezia Spezies rMala s 11 und hMnSOD sowie mit HSA für 5 Tage stimuliert. Die Proliferation wurde mittels Inkorporation von  $^3\text{H}$ Thymidin gemessen und anhand des Stimulationsindex (SI) dargestellt. Der cpm Wert für die Mediumkontrolle betrug in diesem Experiment  $672.5 \pm 96.5$  (mean  $\pm$  SEM) hinweisend für eine effiziente Thymidininkorporation (aus: Balaji and Heratizadeh et al. T cell mediated cross-reactivity between human and Malassezia sympodialis thioredoxin in adult patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunology*, in revision)

Die Mehrheit der kreuzreagierenden T-Zellklone war CD4+ und exprimierte den „skin-homing“ Marker CLA, was die Annahme unterstützt, dass die lokale Entzündungsantwort in der Epidermis bei AD spezifisch potenziert werden könnte. In den Kulturen humaner Keratinozyten ließ sich infolge Stimulation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die Freisetzung von hTrx nachweisen. Diese Beobachtung könnte hinweisend dafür sein, dass in chronisch-entzündlichen AD-Läsionen hTrx aus Keratinozyten freigesetzt wird und in der Folge kreuzreagierende Mala s 13-spezifische T-Zellen aktivieren könnte.

Zusammenfassend konnten wir in Malassezia-IgE-sensibilisierten AD-Patienten auf Ebene der T-Zellen eine Kreuzreaktivität zwischen Mala s 13 aus dem hautkolonisierenden Hefepilz *Malassezia sympodialis* und dem korrespondierenden humanen Antigen hTrx detektieren. hTrx autoreaktive „skin-homing“ T-Zellen könnten für den kutanen Entzündungsprozess bei Malassezia-sensibilisierten AD-Patienten relevant sein. Basierend auf den o.a. Beobachtungen möchten wir weiterführend die Präsenz der humanen Autoantigene, die mit Proteinen der *Malassezia sympodialis* Spezies kreuzreagieren, bei AD näher charakterisieren. Es soll untersucht werden,

ob die Frequenzen Malassezia-Antigen-spezifischer T-Zellen in läsionaler Haut bei chronischer, therapieresistenter AD höher als bei Referenzgruppen sind. Zudem soll auch geklärt werden, ob eine therapeutische Intervention mit Antimykotika bei diesen Patienten zu einer Verringerung von autoreaktiven T-Zellfrequenzen in Haut und Blut führen kann.

■ Projektleitung: Heratizadeh, Annice (Dr. med.); Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Kooperationspartner: Valenta, Rudolf (Prof. Dr. med.), Wien, Österreich; Crameri, R (Prof. Dr. med.), Davos, Schweiz; Scheynius, A (Prof. Dr. med.), Stockholm, Schweden; Förderung: Hannover: DFG KliFo 250, GRK 1441; Wien: Grant F1815 Austrian Science Fund; Davos: Swiss Federal Science Foundation Grant 316030\_128813 / 1, European Community's Seventh Framework Program [FP7-2007-2013] under grant agreement n° HEALTH-F2-2010-260338 "ALLFUN"; Stockholm: Swedish Research Council Medicine

## Weitere Forschungsprojekte

### **Keratinozyten-T-Zellinteraktionen bei Ekzemkrankheiten**

■ Projektleitung: Wittmann, Miriam (Prof. Dr. med.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: DFG, SFB 566, Teilprojekt A6

### **Graduiertenkolleg Regulation der allergischen Entzündung in Lunge und Haut**

■ Projektleitung: Sprecher: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: DFG, GRK 1441/1

### **Role of interaction between infiltrating T-cells and keratinocytes for the development and chronification of allergic eczematous skin diseases**

■ Projektleitung: Wittmann, Miriam (Prof. Dr. med.); Förderung: DFG, GRK 1441/1

### **Untersuchungen zur Rolle des Histamin H4 Rezeptors im Vergleich zu anderen Rezeptoren bei allergischen Entzündungen der Haut**

■ Projektleitung: Gutzmer, Ralf (Prof. Dr. med.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: DFG Gu434/5-2, EU (COST action BM0806, Recent advances in Histamine receptor H4R research)

### **Entwicklung eines medizinischen UV-Bestrahlungsgerätes mit Minimierung des Karzinomrisikos durch umfeldfreie Bestrahlung und mit automatischer Konturierung sowie genau definierbaren Dosen der Bestrahlungsfelder**

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AIF), Projektträger des BMWi und Wirtschaft

### **Entwicklung eines neuen innovativen Medikaments zur Behandlung Th1-vermittelter chronisch entzündlicher Hauterkrankungen auf der Basis eines Tbet-spezifischen DNAzyms**

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AIF), Projektträger des BMWi und Wirtschaft

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

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.), Heratizadeh, Annice (Dr. med.); Förderung: Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG)

### **Einfluss von Staphylokokkenexotoxinen auf die Interleukin (IL)-22 Produktion von T-Zellen bei chronisch entzündlichen Hautkrankheiten**

■ Projektleitung: Margarete Niebuhr (Dr. med.); Förderung: HiLF MHH

## Untersuchung zur Rolle von erhitzten birkenpollenassoziierten Nahrungsmitteln bei der atopischen Dermatitis

■ Projektleitung: Wichmann, Katja (Dr. med.); Förderung: HiLF MHH

---

### Abstracts

2010 wurden 12 Abstracts publiziert.

### Promotionen

AlGazahl, Michel (Dr. med.): Prognostische Faktoren des Schildwächterlymphknotens für Patienten mit malignem Melanom.

Kasraie, Sadaf (PhD): Dysregulation of innate and adaptive immunity in patients with atopic dermatitis: Impact of IL-31/IL-31R and staphylococcal  $\alpha$ -toxin.

Kopfnagel, Verena (Dr. rer. nat.): Influence of keratinocytes on infiltrating T-cells in inflammatory skin diseases.

Nieten, Christine (Dr. med.): Die wichtige Rolle der eosinophilen Granulozyten bei der atopischen Dermatitis - neuroimmunologische Interaktion.

Rolfes, Sebastian (Dr. med.): Korrelation von Metastasierungswegen und Prognose mit der Expression von Chemokin- und RANK-Rezeptoren beim malignen Melanom.

Zeitvogel, Jana (Dr. rer. nat.): Interaction of keratinocytes with infiltrating lymphocytes in allergic eczematous diseases: The impact of IL-27.

Zwingmann, Katja (Dr. med.): Expression und Funktion des Histamin H4 Rezeptors auf humanen T-Zellen.

### Stipendien

Satzger, Imke (Dr. med.): Habilitationsstipendium der Hiege-Stiftung.

### Wissenschaftspreise

Kasraie, Sadaf (PhD): Posterpreis der European Academy of Allergy and Clinical Immunology, London.

### Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Gutzmer, Ralf (Prof. Dr. med.): Wissenschaftliche Gutachtertätigkeit: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Deutsche Krebshilfe; Vorstandsmitglied der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO).

Kapp, Alexander (Prof. Dr. med.): Wissenschaftliche Gutachtertätigkeit; Herausgeber der Zeitschrift Hautarzt; Mitglied des Editorial Boards von Allergologie und Int Arch Allergy Immunol.

Raap, Ulrike (Prof. Dr. med.): Wissenschaftliche Gutachtertätigkeit; Mitglied der Task Force European Exam on Allergology and Clinical Immunology der European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI); Board Member der Section Dermatology der EAACI; Mitglied des Beirates der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI).

Wedi, Bettina (Prof. Dr. med.): Wissenschaftliche Gutachtertätigkeit; Mitglied des Editorial Board von Case Reports in Medicine; Mitglied des Advisory Board von Allergologie, Allergo J; Mitglied des Web Editorial Board der World Allergy Organisation (WAO); Mitglied des wissenschaftlichen Beirats der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie; Leitlinienbeauftragte der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie (DGAKI); Leiterin Subkommission Allergologie der Kommission Qualitätssicherung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG).

Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.): Wissenschaftliche Gutachtertätigkeit: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG); Hauptschriftleiter der Zeitschrift Allergologie; Section Editor Dermatology in Curr Opin Allergy Clin Immunol, Mitglied der Editorial Boards von Hautarzt, JDDG, Allergo J, Allergy, Int Arch Allergy Clin Immunol.; Chairman der IG Food Allergy der Europäischen Akademie für Allergologie und klinische Immunologie (EAACI), Vizepräsident der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie (DGAKI).