

Abteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie

■ Leiter: Prof. Dr. Thomas Werfel

Tel.: 0511 / 9246-450 • E-Mail: werfel.thomas@mh-hannover.de • www.mh-hannover.de/immundermatologie.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) derzeit im Mittelpunkt der meisten Untersuchungen. Die Forschungsabteilung wurde erst 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, im Sonderforschungsbereich 566 und im 2006 gegründeten 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: Untersuchungen zur Bedeutung des TLR-2 für die häufige bakterielle Hautkolonisierung mit *Staphylococcus aureus* bei atopischer Dermatitis

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine der häufigsten chronisch entzündlichen Hauterkrankungen mit steigender Prävalenz, von der 10-20% der Kinder und 1-3% der Erwachsenen in Industrienationen betroffen sind. Es konnte gezeigt werden, dass 80-100% der AD-Patienten mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) kolonisiert sind, wohingegen der Keim nur 5-30% der gesunden Bevölkerung mit Betonung der intertriginösen Areale besiedelt. Dabei korreliert die Besiedlungsdichte läsionaler und nicht läsionaler Haut positiv mit der Schwere der Erkrankung. Umgekehrt führt eine temporäre antibiotische oder antiseptische Eradikation von *S. aureus* häufig zu einer Hautverbesserung.

Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem sind an der Erkennung von mikrobiellen Pathogenen beteiligt. Die zum angeborenen Immunsystem gehörenden Toll-like-Rezeptoren (TLR) können unterschiedliche Pathogene erkennen. TLR-2 ist maßgeblich an der Erkennung von Gram-positiven Bakterien, insbesondere *S. aureus*, beteiligt und bildet Heterodimere mit TLR-1 und TLR-6. TLR-1 ist als Korezeptor hauptsächlich für die Erkennung von triacylierten Lipopeptiden wie Pam3Cys verantwortlich, wohingegen diacylierte Lipopeptide wie Lipoteichonsäure (LTA) über TLR-2/TLR-6 Heterodimere erkannt werden. Peptidoglycan (PGN) ist ein Hauptbestandteil der Bakterienwand von Gram-positiven Bakterien und induziert eine Signaltransduktion über TLR-2, NOD 1 und NOD 2 Rezeptoren. Wir haben für unsere Untersuchungen Makrophagen gewählt, weil bekannt ist, dass sie bei AD in akut und chronisch entzündeter Haut akkumulieren, TLR-2 konstitutiv exprimieren und neben ihrer Funktion als Phagozyten eine wichtige Quelle proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 und IL-12 darstellen.

Makrophagen von AD-Patienten und gesunden Kontrollen wurden durch 5-7-tägige Zellkultur aus PBMCs gewonnen und mit PGN, LTA und Pam3Cys zeit- und konzentrationsabhängig stimuliert. Die TLR-2 Expression und die Zytokinproduktion nach TLR-2-Stimulation wurden auf mRNA-Ebene mittels quantitativer real time PCR und auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Da TLR-2-Liganden Heterodimere mit TLR-1 und TLR-6 bilden und es keinen selektiven TLR-2-Liganden gibt, haben wir zusätzlich die TLR-1- und TLR-6-Expression in Makrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf mRNA-Ebene untersucht, um Veränderungen in diesen Pathways näher eingrenzen zu können. Des Weiteren haben wir die TLR-2-Expression auf Makrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen immunhistochemisch in der Haut untersucht.

Wir konnten in der vorliegenden Studie zeigen, dass Makrophagen von AD-Patienten signifikant weniger TLR-2 exprimierten als Makrophagen von gesunden Kontrollen (Abb. 1).

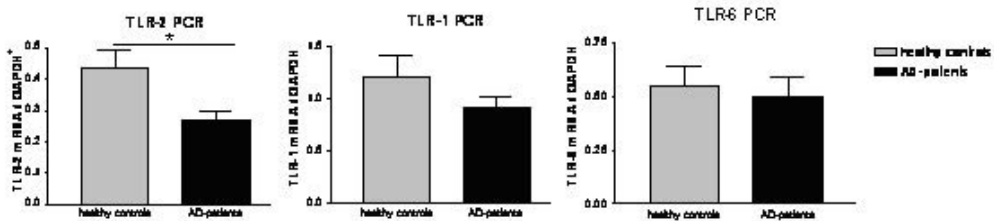


Abb. 1: Verminderte TLR-2, aber nicht TLR-1 und TLR-6 Expression in Makrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf mRNA-Ebene. mRNA von 1x10⁵ Makrophagen wurde isoliert und mittels quantitativer real time PCR die TLR-2 (links), TLR-1 (Mitte) und TLR-6 (rechts) Expression bestimmt. Dargestellt sind mittlere TLR-2 (oben), TLR-1 (Mitte) und TLR-6 (unten) / GAPDH mRNA-Mengen + SEM von n=15 AD-Patienten und n=10 gesunden Kontrollen. +x10⁻². *p<0,05.

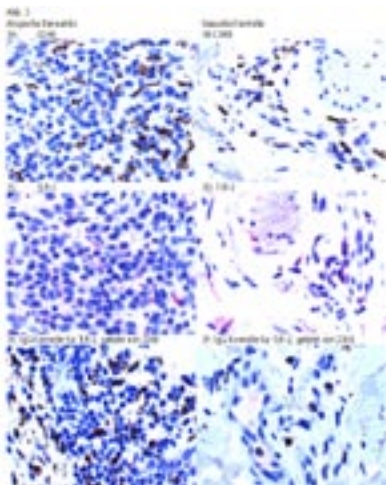


Abb. 2: Verminderte TLR-2 Expression in Hautmakrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Immunhistologische Färbungen zeigen die TLR-2 Expression (C, D) in Makrophagen (A, B) aus dem entzündeten dermalen Infiltrat von AD-Patienten (A, C) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (B, D) und die Isotypkontrollen für TLR-2 (E, F), die mit CD68 gegengefärbt wurden. Repräsentatives Beispiel. 400-fache Vergrößerung.

Eine verminderte TLR-2 Expression in Makrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen war auch immunhistochemisch in der Haut nachweisbar (Abb. 2). Keine Unterschiede zwischen Makrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen konnten in Bezug auf die TLR-1 und TLR-6 Expression nachgewiesen werden (Abb. 1). In Abhängigkeit vom TLR-2-Liganden produzierten Makrophagen von AD-Patienten nach TLR-2-Stimulation weniger proinflammatorische Zytokine im Vergleich zu Makrophagen von gesunden Kontrollen: (i) Nach Stimulation mit dem TLR-2/TLR-6 Liganden LTA sezernierten Makrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen weniger IL-6. (ii) Eine Stimulation der Makrophagen mit dem TLR-2/NOD-Liganden PGN führte zu einer verminderten IL-1 β Sekretion in AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. (iii) Die IL-8-Sekretion war in Makrophagen von

AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermindert nach Stimulation mit LTA respektive PGN. Die funktionellen Ergebnisse nach TLR-2-Stimulation konnten nicht auf mRNA-Ebene reproduziert werden. Keine Unterschiede konnten in Bezug auf die IL-12 und TNF- α Produktion auf Makrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach TLR-2-Stimulation nachgewiesen werden.

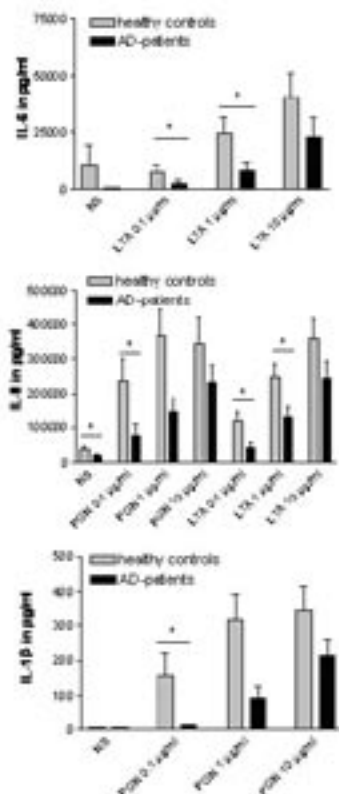


Abb. 3: Effekte einer TLR-2 Stimulation mit LTA respektive PGN auf die IL-6, IL-8 und IL-1 β Sekretion aus Makrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. 1×10^5 Makrophagen wurden entweder nicht stimuliert (NS) oder für 48h mit den genannten TLR-2 Liganden in den genannten Konzentrationen stimuliert. Die Konzentrationen von IL-6 (links), IL-8 (Mitte) und IL-1 β (rechts) wurden mittels ELISA in den zellfreien Kulturüberständen quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=13-16 AD-Patienten und n=8-10 gesunden Kontrollen. *p<0,05.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse zum ersten Mal eine verminderte TLR-2 Expression und funktionelle Unterschiede TLR-2 vermittelter Effekte in Makrophagen von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Makrophagen von AD-Patienten haben eine verminderte Fähigkeit, proinflammatorische Zytokine produzieren, was eine Erklärung für die erhöhte Empfänglichkeit gegenüber bakteriellen Infektionen mit *S. aureus* sein könnte. Unsere Daten deuten auf eine Dysbalance von AD-Patienten sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem. Laufende Studien fokussieren nun auf Inflammasom-abhängige Regulationsmechanismen als weitere Bestandteile des angeborenen Immunsystems nach Stimulation mit Staphylokokkenbestandteilen, um Erklärungen für die erhöhte Hautkolonisierung und -Infektion mit *S. aureus* zu gewinnen und neue therapeutische Optionen aufzuzeigen, mit denen die Dysbalance in angeborener und erworbener Immunität aufgehoben werden kann.

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.), Niebuhr, Margarete (Dr. med.); Förderung: MHH (LOM) sowie Deutsche Dermatologische Gesellschaft (Nachwuchsstipendium Frau Dr. Niebuhr)

Weitere Forschungsprojekte

Graduiertenkolleg Regulation der allergischen Entzündung in Lunge und Haut

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

Autoimmunphänome bei der atopischen Dermatitis

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

Keratinozyten-T-Zellinteraktionen bei Ekzemkrankheiten

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

Keratinozyten-T-Zellinteraktionen bei Ekzemkrankheiten

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

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 Gu434/5-1, EU (COST action BM0806, Recent advances in Histamine receptor H4R research)

The pathogenic role of keratinocytes in cutaneous lupus erythematosus

■ Projektleitung: Wittmann, Miriam (Prof. Dr. med.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: DFG Wi1822/5-1

Untersuchung zur Rolle von erhitzten birkenpollenassoziierten Nahrungsmitteln bei der atopischen Dermatitis

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

Entwicklung eines topisch anwendbaren Prototyps des antimikrobiellen Peptids HBD-2 zur Reduktion der hautbesiedlung mit Staphylococcus aureus

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

Untersuchung von prognostisch relevanten Parametern bei der atopischen Dermatitis

■ Projektleitung: Wichmann, Katja (Dr. med.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Kooperationspartner: Schnuch, Axel (Prof. Dr. med.), IVDK-Zentrale an der Universität Göttingen, Uter, Wolfgang (Prof. Dr. med.), Abteilung für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie der Universität Erlangen/Nürnberg; Förderung: Karl-Wilder-Stiftung

Die Rolle von TLR-Polymorphismen für die häufige bakterielle Hautkolonisierung mit Staph. aureus bei atopischer Dermatitis

■ Projektleitung: Niebuhr, Margarete (Dr. med.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: Deutsche Dermatologische Gesellschaft (Nachwuchsstipendium)

Untersuchung des Einflusses von Calcineurininhibitoren auf die Interaktion zwischen Keratinozyten und T-Lymphozyten

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.), Wichmann, Katja (Dr. med.); Förderung: Wirtschaft

Abstracts

2009 wurden 5 Abstracts publiziert.