

## Forschungsabteilung Immundermatologie und experimentelle Allergologie

### ■ Leiter: Prof. Dr. Thomas Werfel

Tel.: 0511/532-5092 • E-Mail: werfel.thomas@mh-hannover.de • [www.mh-hannover.de/immundermatologie.html](http://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) und zur Psoriasis derzeit im Mittelpunkt. 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) 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 auf den Bericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie verwiesen.

### Forschungsprojekte

#### Forschungsschwerpunkt: Autoimmunität bei atopischer Dermatitis

Bei der atopischen Dermatitis (AD) handelt es sich um eine entzündliche Hauterkrankung mit chronisch-rezidivierendem Verlauf. Eine Vielzahl von Faktoren spielt im Krankheitsverlauf der atopischen Dermatitis eine Rolle. So können zum Beispiel genetische Faktoren zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Hautbarriere führen, was eine Sensibilisierung auch gegenüber mikrobiellen Allergenen zusätzlich zu Nahrungsmittel- und Aeroallergenen erleichtert. Bei 80% der erwachsenen Patienten sind spezifische IgE-Antikörper gegen perenniale, saisonale und/oder Nahrungsmittelallergene nachweisbar.

Darüber hinaus ist schon seit den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt, dass Atopie-Patienten auch positive Pricktestreaktionen auf humane Zellextrakte zeigen können. In den vergangenen Jahren konnten verschiedene humane Autoallergene identifiziert und isoliert werden: Eine besondere Untergruppe stellen dabei solche Autoallergene dar, die keine Homologien zu bekannten Umwelt-Allergenen aufweisen (Hom s 1 - s 5; sog. A-Ag). Im Gegensatz zu B-Ag, für welche wir auf T-Zellebene kürzlich für ein mikrobielles Antigen ein hohes Maß an Kreuzreaktivität zu einem humanen Protein bei atopischer Dermatitis zeigen konnten (Balaji et al. 2011, J. Allergy Clin. Immunol.), ist hier nicht eine Homologie im Sinne eines „molecular mimicry“ der Sensibilisierung zugrunde liegend. Vielmehr wird postuliert, dass es beispielsweise durch einen mechanischen Reiz wie Kratzen zur Freisetzung von intrazellulären epithelialen Antigenen/Autoallergenen und in der Folge zur (Auto-) Sensibilisierung kommt.

In den letzten Jahren konnten wir in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor R. Valenta, Wien, erstmals bei Patienten mit AD eine T-Zell-vermittelte Immunantwort gegenüber dem Autoallergen  $\alpha$ -NAC (Hom s 2) nachweisen. In weiterführenden Arbeiten konnten wir aus läsionaler Haut und peripherem Blut von Patienten mit AD  $\alpha$ -NAC-spezifische T-Zell-Klone isolieren. Die aus läsionaler Haut generierten  $\alpha$ -NAC-spezifischen T-Zellklone produzierten vornehmlich IFN- $\gamma$  und zum Teil auch IL-17 (Heratizadeh et al. 2011 Br. J. Dermatol.). Während aus der Haut fast ausschließlich

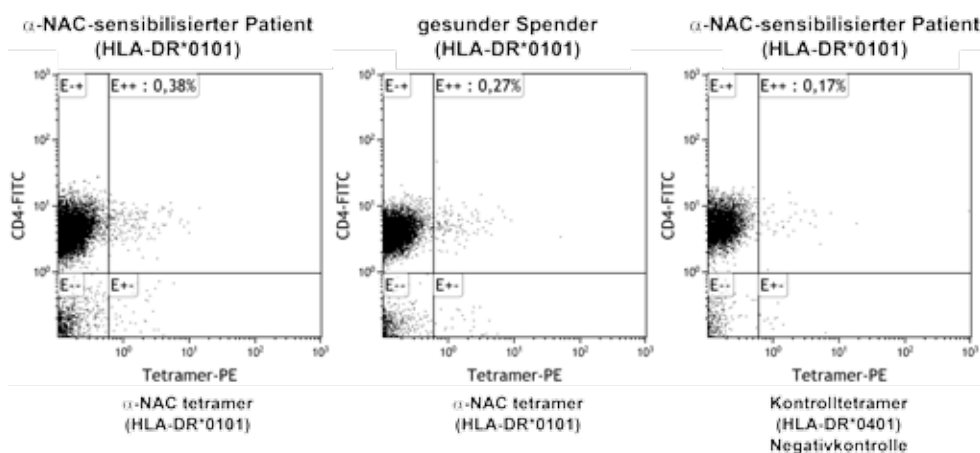
CD4+ T-Zellklone isoliert werden konnten, konnten aus dem Blut vornehmlich CD8+ T-Zellklone generiert werden.

l) Im ersten Teilprojekt wurden 2011 die  $\alpha$ -NAC-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen nun näher charakterisiert und immundominante Epitope von  $\alpha$ -NAC identifiziert. Hinsichtlich spezifischer CD4+ T-Lymphozyten wurden zur Identifizierung von MHC-Klasse II-Epitopen T-Zell-Linien für das Gesamtprotein  $\alpha$ -NAC von Patienten mit AD und IgE-Sensibilisierung auf  $\alpha$ -NAC angelegt. Das Zytokinprofil dieser Peptid-spezifischen T-Zell-Linien war ebenfalls Th1-dominiert, daneben waren auch Th2-, Th0- und Th17-Linien zu finden. Diese wurden anschließend mit sich überlappenden Fragmenten des Proteins  $\alpha$ -NAC (bestehend aus jeweils 15 Aminosäure-Peptiden), restimuliert. Diese „15-mer“-Peptide zeichnen sich dadurch aus, dass sie ausschließlich über MHC-II-Moleküle gebunden und damit CD4+ T-Helferzellen präsentiert werden können. Mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbau wurde die Proliferaton der T-Zell-Linien bestimmt. So konnten zwei immundominante Peptide aus  $\alpha$ -NAC identifiziert werden.

Zur Identifikation von immunogenen Epitopen zur Präsentation über MHC Klasse I an CD8+ T-Lymphozyten wurden zum einen wiederum Proliferationsassays mit Stimulation von PBMC durch „8-mer“-Peptide durchgeführt. Da diese Peptide sowohl von MHC-Klasse I- wie auch von Klasse II-Molekülen präsentiert werden können, wurde hier gezielt die Proliferaton der CD8+ T-Zellen mittels CFSE-Markierung detektiert. Zum anderen wurden die Kandidatenpeptide hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an MHC-Klasse I-Moleküle auf der humanen Zelllinie T2 untersucht, da die Bindungsfähigkeit einen deutlichen Hinweis für die Immunogenität eines Peptids darstellt. Es konnten hier ebenfalls zwei immundominante Peptide identifiziert werden.

Seit 15 Jahren ermöglicht der Einsatz von MHC-Tetrameren eine nähere Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen. Durch die Beladung von MHC-Tetrameren mit einem immunogenen Epitop können über deren Bindung an den T-Zell-Rezeptor Antigen-spezifische T-Zellen markiert werden. Mittels MHC-Tetrameren ist nicht nur eine Visualisierung und Bestimmung der Frequenz Antigen- (und Allergen)-spezifischer T-Zellen, sondern auch deren Isolation und phänotypische Charakterisierung möglich.

Über Kooperation mit Dr. W. Kwok, Seattle, sowie über kommerziellen Bezug verfügen wir mittlerweile sowohl

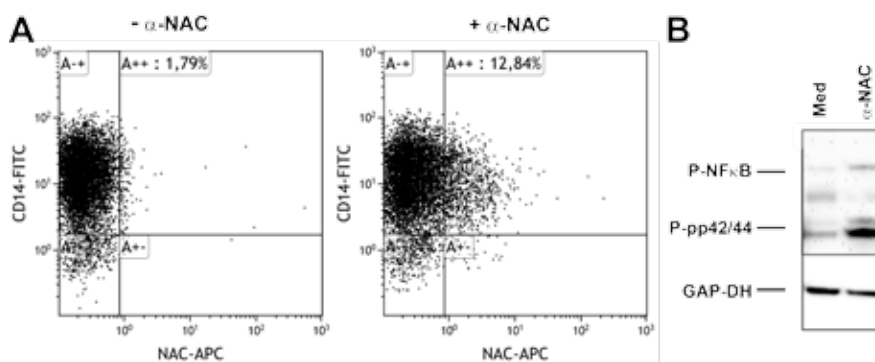


**Abb. 1:** Tetramer-Färbung von  $\alpha$ -NAC-spezifischen CD4+ T-Lymphozyten; die Färbung erfolgte nach Anreicherung der spezifischen T-Zellen durch 14-tägige Stimulation mit dem entsprechenden Peptid. Nach Ausschluss nicht-vitaler Zellen und Monozyten kann für eine Subpopulation an CD4+ T-Lymphozyten Bindung des  $\alpha$ -NAC-spezifischen Tetramers nachgewiesen werden. In  $\alpha$ -NAC IgE-sensibilisierten Patienten mit AD ist die Frequenz dieser verglichen mit gesunden Spendern deutlich erhöht. Durch den Einsatz eines Negativkontroll-Tetramers konnte ein geringes Maß an unspezifischer Bindung detektiert werden. Angegebene Werte beziehen sich auf den Anteil der CD4+Tetramer+Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation.

über MHC-Klasse I- als auch über Klasse II- Tetramere, welche  $\alpha$ -NAC-spezifische T-Zellen mithilfe der identifizierten immunogenen Epitope binden (vgl. Abb. 1). Diese MHC-Tetramere werden zur Ex-vivo-Analyse der Allergen-spezifischen T-Lymphozyten eingesetzt, um nähere Erkenntnisse über deren Frequenz und spezifische Eigenschaften zu gewinnen.

II) Im Fokus des zweiten Teilprojekts stand 2011 die nähere Untersuchung der Immunmechanismen, die einer T-Zellaktivierung durch  $\alpha$ -NAC zugrunde liegen. Mittels FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -NAC nicht nur CD4+ T-Helferzellen, sondern auch Monozyten bindet (vgl. Abb. 2). Die Monozyten wurden durch die Stimulation mit  $\alpha$ -NAC aktiviert, was sich zum einen anhand der Phosphorylierung von p44/42 (Erk) und NF- $\kappa$ B zeigte. Zum anderen induzierte  $\alpha$ -NAC in den Monozyten die Expression und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 p40 und IL-6, die wiederum T-Zellen aktivieren können.

Wurden PBMCs mit  $\alpha$ -NAC stimuliert, konnte außerdem mittels Western Blot neben einer p44/42- und NF-



**Abb. 2:**  $\alpha$ -NAC bindet und aktiviert Monozyten. A) PBMCs wurden mit  $\alpha$ -NAC inkubiert, diese Bindung wurde anschließend mittels FACS mit einem  $\alpha$ -NAC-spezifischen Antikörper (APC-markiert) sowie einem FITC-gekoppelten Antikörper für den Monozyten-Marker CD14 nachgewiesen. Der Anteil  $\alpha$ -NAC+ CD14+ Zellen steigt von 1,79% ohne Inkubation mit  $\alpha$ -NAC auf 12,84% bei Inkubation mit  $\alpha$ -NAC. B) Monozyten wurden 30 Minuten mit  $\alpha$ -NAC stimuliert. Die daraus hergestellten Proteinextrakte wurden im Western Blot auf Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B und p44/42 analysiert, abgeglichen wurden diese Banden mit dem „Haushalts“-Protein GAP-DH. Nach Stimulation mit  $\alpha$ -NAC erhöhte sich die Menge an phosphoryliertem NF- $\kappa$ B und p44/42 bei unveränderter Menge an GAP-DH. Dies zeigt eine Aktivierung und eine inflammatorische Reaktion der Monozyten an.

$\kappa$ B-Phosphorylierung auch eine Phosphorylierung von STAT3 gezeigt werden. STAT3 ist als ein entscheidendes Signalmolekül in Th17-Zellen beschrieben, das essentiell für die Differenzierung und Effektorfunktion dieser Zellen ist. In PBMCs wurde durch  $\alpha$ -NAC die Expression und Sekretion von Th1- und Th17-Zytokinen induziert, verstärkt wurde dieser Effekt durch das T-Zell-aktivierende Zytokin IL-2. Diese  $\alpha$ -NAC-induzierten Zytokineffekte ließen sich wiederum durch eine Vorbehandlung der PBMCs mit einem spezifischen STAT3-Inhibitor hemmen.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von STAT3 für die Immunantwort, welche  $\alpha$ -NAC in vitro und ex vivo bei einer Untergruppe von Patienten mit AD induziert.

Zusammenfassend wurden die Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der „Autoallergie“ bei AD mit Fokussierung auf die Immunantwort auf  $\alpha$ -NAC fortgeführt. Es konnte bisher eine Bindung des Moleküls an Monozyten und T-Zellen nachgewiesen werden, wobei die relevanten Bindungsmoleküle noch zu identifizieren sind. Des Weiteren ließen sich Zellantworten auf  $\alpha$ -NAC-Bindung auf der Ebene der Signaltransduktion sowie der Zytokinproduktion und -ausschüttung bei Monozyten sowie PBMCs näher beschreiben. Hinsichtlich der Präsentation von  $\alpha$ -NAC an den T-Zellrezeptor konnten sowohl für MHC-Klasse I wie auch für Klasse II immundominante Peptide identifiziert werden. Diese bilden

auch die Grundlage für die Produktion von  $\alpha$ -NAC-spezifischen MHC-Tetrameren, die eine tieferegehende Analyse der Autoallergen-spezifischen T-Zellen ermöglichen sollen.

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: DFG, Klinische Forschergruppe 250, Teilprojekt 6: WE 1289/8-1 AOBJ: 579752; DFG, GRK 1441/1

## Weitere Forschungsprojekte

### **Autoreaktive T-Lymphozyten bei atopischer Dermatitis**

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: DFG, Klinische Forschergruppe 250, Teilprojekt 6: WE 1289/8-1 AOBJ: 579752

### **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 bzw. 1441/3

### **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 bzw. 1441/3

### **KMU-Innovativ-6: Entwicklung des Vorproduktes eines Therapeutikums zur effizienten kutanen Infektionsabwehr und Wundheilung durch die Kombination verschiedener humaner antimikrobieller Peptide**

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: BMBF, Projektträger Jülich (ptj): 0315917B

### **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: BMWi, Projektträger Aif/ZIM Berlin: KF 2117402 FR9

### **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: BMWi, Projektträger Aif/ZIM Berlin: KF 2117403 FR0

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

■ Projektleitung: Heratizadeh, Annice (Dr. med.); Werfel, Thomas (Prof. 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

### **Impact of the TNF-alpha inhibitor Etanercept on TLR-2 and staphylococcal exotoxin induced immunological effects in monocytes/macrophages from patients with psoriasis**

■ Projektleitung: Niebuhr, Margarete (Dr. med.); Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: Wirtschaft

**Originalpublikationen**

**Abstracts**

2011 wurden 5 Abstracts publiziert.

**Stipendien**

Stipendien, Auszeichnungen und wissenschaftliche Preise: siehe Forschungsbericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie u. Venerologie