

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

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 atopischer Dermatitis (AD) handelt es sich um eine entzündliche Hauterkrankung mit chronisch-rezidivierendem Verlauf. Wie bei allen Ekzemkrankheiten ist ein T-Zell-dominiertes mononukleäres Hautinfiltrat in der Haut nachweisbar, welches maßgeblich zur klinischen Symptomatik beiträgt. Dendritische Zellen in der Haut können an IgE-gebundene Allergene durch Interaktion mit Fc ϵ -Rezeptoren internalisieren, im Zellinneren prozessieren und auf ihrer Oberfläche T-Zellen präsentieren, die so aktiviert werden.

Ungefähr 80% der erwachsenen Patienten mit atopischer Dermatitis haben Sensibilisierungen gegenüber saisonalen sowie perennialen Aeroallergenen und/oder Lebensmittelallergenen, die mit Allergen-spezifischen IgE und Allergen-spezifischen T-Zellen assoziiert sind. Die Spezifität eines Großteils dieser IgE-Antikörper bleibt jedoch bei stark erhöhten Gesamt-IgE-Spiegeln unbekannt, wobei in den letzten Jahren in einer Reihe von Untersuchungen autoreaktive IgE bei atopischer Dermatitis beschrieben wurden.

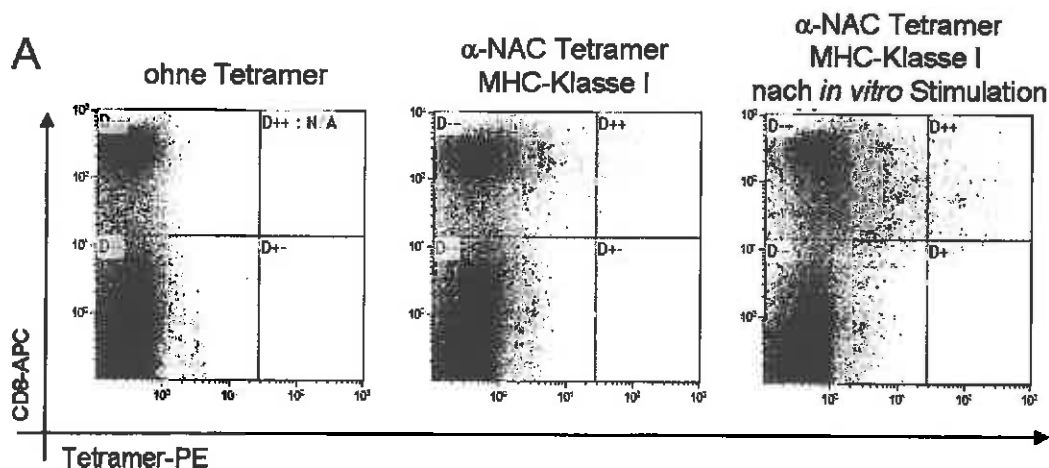
Darüber hinaus weist eine bedeutende Anzahl an Patienten mit atopischer Dermatitis keine Allergen-spezifischen IgE-Sensibilisierungen auf, weshalb vorgeschlagen wurde, die Bezeichnung zu ändern (z.B. in konstitutionelle Dermatitis). Bezüglich dieser nicht-allergischen, sogenannten intrinsischen Form der atopischen Dermatitis wird seit längerem diskutiert, inwiefern Autoreaktivität zum oft auch chronischen Krankheitsbild beitragen könnte.

1) Kürzlich konnten wir immundominante T-Zell-Epitope des Autoallergens α -NAC identifizieren. Das gemäß der Allergen-Nomenklatur der IUIS (International Union of Immunological Societies) auch als Homo s 2 (Homo sapiens Allergen 2) bezeichnete humane Protein α -NAC (α -Untereinheit des „nascent polypeptide-associated complex“) ist als Chaperon ubiquitär an der Proteinsynthese innerhalb der Zelle beteiligt. Bei α -NAC handelt es sich um ein normalerweise intrazelluläres, Atopie-assoziiertes Autoantigen ohne vorbekannte generelle Kreuzreaktivität zu Umweltallergenen. Seine Eigenschaft als Autoantigen („Autoallergen“) bei atopischer Dermatitis wurde initial auf humoraler Ebene (d.h.

durch den Nachweis von spezifischen IgE) beschrieben. Im eigenen Kollektiv konnten wir bei 23% der AD-Patienten α -NAC-spezifisches IgE im Serum nachweisen und charakterisierten in einer Studie α -NAC-reaktive T-Zellen aus der Zirkulation sowie aus läsionaler Haut.

Die Erkenntnisse über die immundominanten T-Zell-Epitope ermöglichten die Generierung von MHC-Klasse-I Tetrameren in Kooperation mit der Tetramer Core Facility der NIH (Atlanta, USA) und von MHC-Klasse-II Tetrameren in Kooperation mit W.W. Kwok (Seattle, USA). Durch den Einsatz dieser Reagenzien konnten erstmalig α -NAC-spezifische CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten im Blut von sensibilisierten Patienten identifiziert werden. Durchflusszytometrische Messungen zeigten eine Frequenz Tetramer-bindender T-Zellen in sensibilisierten Patienten nach Anreicherung durch *in vitro*-Stimulation von etwa 0,05-2,5%. Wie bereits für andere Allergene beschrieben, konnten in unseren Untersuchungen auch in gesunden Kontrollindividuen, wenn auch mit niedrigeren Frequenzen, Tetramer-bindende T-Zellen identifiziert werden.

Um der Schwierigkeit der geringen Frequenzen von Tetramer-bindenden T-Lymphozyten zu begegnen, steht uns in Kooperation mit Christian Hennig und Gesine Hansen (Klinik für pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie, MHH) mit der Etablierung der „Chipcytometry“ eine Analysetechnik zur Verfügung, die einen hohen Informationsgehalt für jede einzelne Zelle liefert (www.chipcytometry.com). Speziell für diese Anwendung wurde ein Protokoll entwickelt, wonach im Anschluss an die Fluoreszenzfärbung von Antigen-spezifischen T-Zellen mithilfe von MHC-Tetrameren und mehreren Anreicherungsschritten die Zielzellen mit einem eigens zu diesem Zweck evaluierten Set an Fluoreszenz-markierten Antikörpern untersucht werden können. Auf diese Weise können für jede einzelne Zelle Aussagen über den Subtyp sowohl bezüglich der Polarisierung als auch der Differenzierung getroffen werden. Besonderes Augenmerk legen wir auf den Differenzierungsstatus der Autoantigen-spezifischen Zellen. Mittels Färbung mit CD27-spezifischen Antikörpern konnten wir einen höheren Anteil terminal differenzierter α -NAC-spezifischer T-Zellen in Patienten mit atopischer Dermatitis, bei denen α -NAC-spezifisches IgE nachweisbar war, gegenüber gesunden Kontrollen detektieren. Auf diese Weise konnten wir zwei Tetramer-bindende T-Zellsubpopulationen identifizieren (Abb.1), die pathologische (CD27-) bzw. protektive (CD27+) Immunantworten hervorrufen und bei „klassischen“ Allergien vermehrt vor (CD27-) bzw. nach (CD27+) erfolgreicher Hyposensibilisierungstherapie beschrieben wurden.



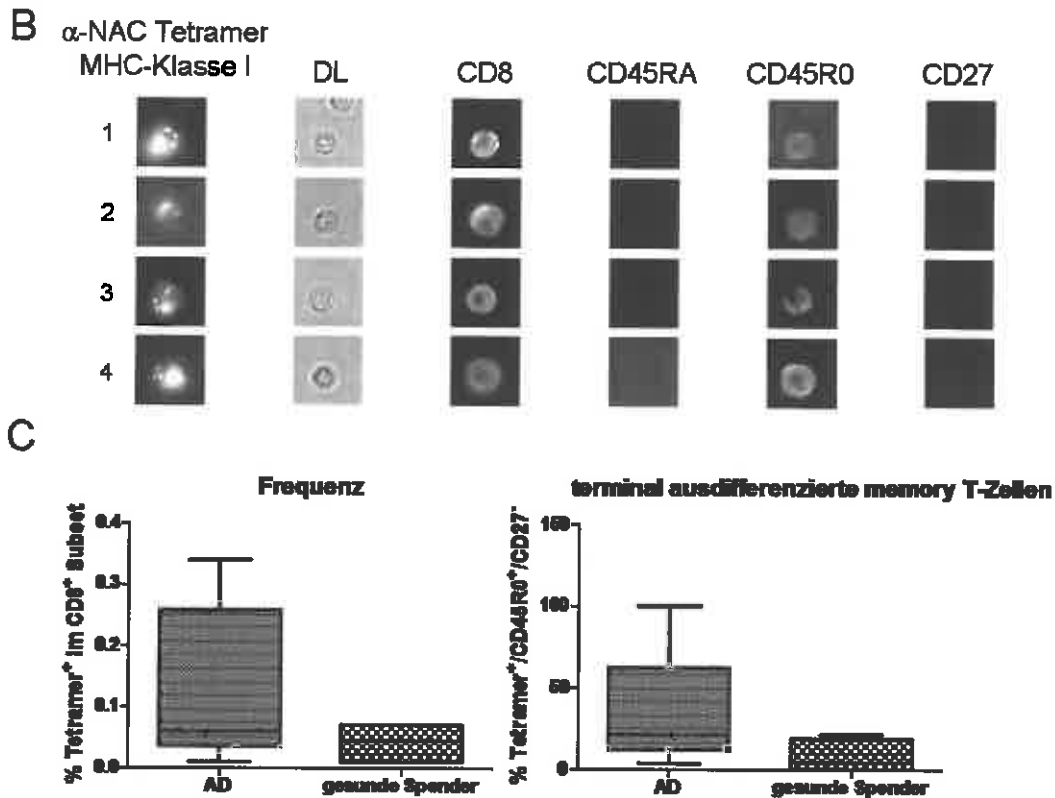


Abb. 1: Einsatz von MHC-Tetrameren zur Identifikation und Charakterisierung von autoreaktiven, α -NAC-spezifischen T-Lymphozyten. **A.** Isolierte PBMC eines Patienten mit atopischer Dermatitis und bekannter humoraler Sensibilisierung gegen α -NAC wurden mit einem spezifischen MHC Klasse I-Tetramer inkubiert und die Bindung an CD8+ T-Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Färbung ist spezifisch auf das CD8+ Kompartiment beschränkt. Durch In-vitro-Stimulation der Zellen mit rekombinantem α -NAC über 28 Tage erhöht sich die Frequenz von 0,5% auf 2,2%.

B. Die Analyse mittels Chipcytometry ermöglicht eine Charakterisierung von α -NAC-spezifischen T-Zellen auf Einzelzell-Ebene. Wie hier beispielhaft dargestellt, tragen diese Tetramer+/CD8+ Zellen den Memory-T-Zell Oberflächenmarker CD45RO und weisen durch Abwesenheit von CD27 einen terminalen Differenzierungsstatus auf.

C. In Patienten mit atopischer Dermatitis ist die Frequenz spezifischer T-Zellen (hier nach Anreicherung über Microbeads) sowie die Frequenz terminal differenzierter Memory-T-Zellen (CD8+/CD45RO+/CD27-) bezogen auf die Gesamtheit der Memory-T-Zellen erhöht. Die MHC-Klasse-I-Tetramere wurden von der NIH Tetramer Core Facility hergestellt.

II) Anders als bei α -NAC konnte durch unsere vorangegangenen Arbeiten bezüglich humanem Thioredoxin (hTrx) bereits eine Kreuzreaktivität mit einem Umweltallergen, Mala s 13, direkt auf T-Zell-Ebene nachgewiesen werden. Wie zuletzt für α -NAC durchgeführt, wurden nun inflammatorische Effekte von Thioredoxin und Mala s 13 auf T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen von sensibilisierten AD-Patienten und nicht-atopischen Spendern untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Zellen von beiden Spendergruppen ähnlich stark reagierten. Durch Thioredoxin und Mala s 13 wurde die Sekretion von Monozyten-Zytokinen wie IL-6 und IL-23 und von T-Zell-Zytokinen wie IFN- γ , IL-17, IL-22 und IL-13 ausgelöst. Ein interessanter und deutlicher, bislang noch nicht beschriebener Unterschied zwischen Patienten mit atopischer Dermatitis und Nicht-Atopikern fand sich in Hinblick auf die IL-10-Sekretion, die in Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis deutlich weniger durch Thioredoxin induziert wurde als in Zellen von Kontrollindividuen.

Thioredoxin und Malassezia 13 beeinflussten auch die Signaltransduktion: Während beide Proteine zur Phosphorylierung von NF- κ B führten, war die Phosphorylierung von p-44/42 stärker in Thioredoxin-stimulierten, die Phosphorylierung von STAT3 hingegen stärker in Malassezia 13-stimulierten PBMC nachweisbar.

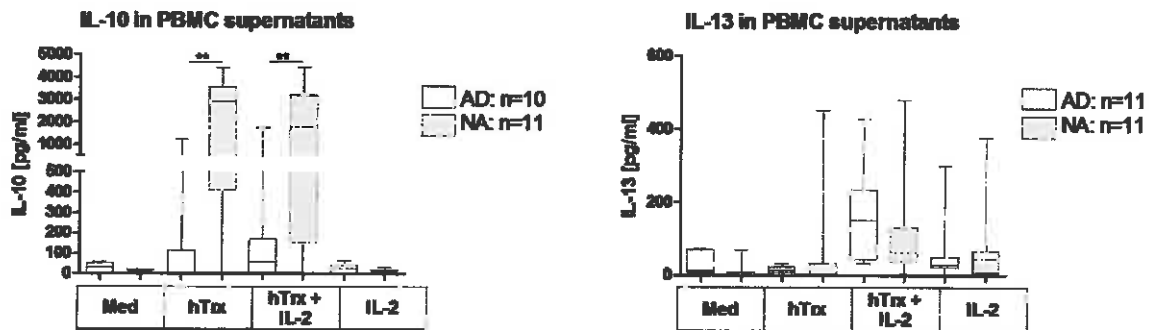


Abb. 2: Abb.2 PBMC Malassezia-sensibilisierter Patienten mit AD sowie nicht-allergischer Spender wurden für 72 h in An- und Abwesenheit von IL-2 mit hTrx stimuliert. In Zellkulturüberständen wurde die Menge an IL-10 und IL-13 mittels ELISA detektiert. **p<0,01.

Mit der Zielsetzung einer genaueren Analyse der Autoallergen-spezifischen T-Zellen führen wir derzeit ein Epitop-Mapping für Thioredoxin durch. Dafür wurden von Malassezia-sensibilisierten AD-Patienten T-Zelllinien in Anwesenheit von Thioredoxin angelegt und anschließend mit MHC-II-Peptiden, abgeleitet aus der Thioredoxin-Primärstruktur, restimuliert. So haben wir bereits zwei Kandidaten immundominanter Peptidsequenzen mit HLA-Allel-übergreifender Reaktivität für die Herstellung von MHC-Klasse II-Tetrameren identifiziert.

Zusammenfassend wurden die Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der „Autoallergie“ bei AD mit Fokussierung auf die Immunantwort auf α -NAC und hTrx fortgeführt. So konnten erstmals autoreaktive T-Lymphozyten mit Relevanz in atopischer Dermatitis mithilfe von MHC-Tetrameren detektiert und analysiert werden. Wie erwartet, ist eine erhöhte Frequenz der spezifischen T-Zellen in AD-Patienten gegenüber gesunden Spendern messbar. Eine vergleichende Untersuchung von direkten Effekten auf Zellen des peripheren Blutes durch das Autoallergen hTrx zeigte, dass in Patienten mit AD im Gegensatz zu gesunden Spendern eine signifikant verringerte Freisetzung eines anti-inflammatorischen Zytokins erfolgt. Weiterführende Experimente sollen in Zukunft durch den Einsatz weiterer MHC-Tetramere den Beitrag humaner Autoantigene und den korrespondierenden autoreaktiven T-Zellen in atopischer Dermatitis genauer beleuchten.

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Cramer, Reto (Prof. Dr.), Swiss Institute of Allergy and Asthma Research (SIAF), Davos, Schweiz; Hansen, Gesine (Prof. Dr.), Klinik für pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie, MHH; Hennig, Christian (Dr.), Klinik für pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie, MHH; Kwok, William W. (Dr.), Benaroya Research Institute, Seattle, USA NIH Tetramer Core facility, Atlanta, USA; Scheynius, Annika (Prof. Dr.), Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden; Valenta, Rudolf (Prof. Dr.), Medizinische Universität, Wien, Österreich; Förderung: DFG Klinische Forschergruppe 250 WE1289/8-1

Weitere Forschungsprojekte

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)

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

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 digitalen Dermatoskopiegerätes mit erweitertem Diagnoseumfang für das automatisierte Ganzkörper-Hautkrebs-Screening (HKS)

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: BMWi, Projektträger Aif/ZIM Berlin: KF 2117405 FR1

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.); Kooperationspartner: Gieler, Uwe (Prof. Dr. med.), Justus-Liebig-Universität Gießen; Förderung: Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG)

Untersuchung der spezifischen T-Zell-Antwort auf Hausstaubmilbenallergene bei erwachsenen Patienten mit atopischer Dermatitis

■ Projektleitung: Heratizadeh, Annice (Dr. med.); Förderung: HiLF, MHH

Untersuchungen des Effekts von Pollenexpositionen in einem Expositionsraum auf die Haut bei Patienten mit atopischer Dermatitis (Neurop)

■ Projektleitung: Heratizadeh, Annice (Dr. med.), Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Kooperationspartner: Hohlfeld, Jens (Prof. Dr. med.); Fraunhofer ITEM; Förderung: Wirtschaft

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 siehe bei Klinik für Dermatologie, Allergologie u. Venerologie

Abstracts

2012 wurden 5 Abstracts publiziert.