

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

■ Keywords: Immundermatologie, Allergologie, Dermatitis, Psoriasis, Autoimmunität

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 derzeit Untersuchungen zu Ekzemkrankheiten (atopische Dermatitis, allergisches Kontaktekzem) und zur Psoriasis 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

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch-rezidivierende Hauterkrankung, die meist im Kindesalter beginnt und 5-15% der Kinder betrifft. Die Prävalenz nimmt im Erwachsenenalter ab und erreicht dann etwa 2-5%. Typisch sind juckende Hautläsionen, die im akuten Zustand eher rötlich-nässend sind und im chronischen Zustand zunehmend trocken-lichenifiziert werden. Diese Läsionen sind charakterisiert durch Infiltrate mononukleärer Zellen, darunter vor allem T-Zellen. Weiterhin weisen etwa 80% der Patienten die sogenannte extrinsische Form der AD auf, die durch erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel und erhöhtes IgE gegen aerogene oder Nahrungsmittelallergene charakterisiert ist. Eine Untergruppe der Patienten mit AD zeigt darüber hinaus IgE- und T-Zell-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen auf körpereigene Antigene, was als Autoallergie bezeichnet wird. In verschiedenen Studien wiesen 23-91% der untersuchten Patientenpopulationen solche Autoimmunphänomene auf.

Unklar ist bisher, wie es zu einer solchen Autosensibilisierung kommen kann. Jedoch gibt es bereits Hinweise, dass Autoallergene immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, die eine Sensibilisierung erleichtern könnten (Mittermann et al., Br J Dermatol, 2008). Um dies genauer zu untersuchen, nutzten wir die zwei Autoallergene α -NAC und hTrx, die uns in rekombinanter Form von unseren Kooperationspartnern in Wien (Rudolf Valenta) und in Davos (Reto Cramer) zur Verfügung gestellt wurden. Mit diesen rekombinanten Proteinen charakterisierten wir bereits die spezifischen T-Zell-Antworten sensibilisierter Patienten mit AD auf diese Autoallergene (Heratizadeh et al. 2011 Br. J. Dermatol.; Balaji et al. 2011, J. Allergy Clin. Immunol.).

α -NAC (α -chain of the nascent polypeptide-associated complex, Hom s 2) gehört zur Gruppe der Autoallergene, für die keine Kreuzreaktivität zu exogenen Allergenen bekannt ist und die daher als Homo sapiens (Hom s)-Allergene in die IUIS-Nomenklatur aufgenommen wurden. Dagegen wurde für hTrx eine Kreuzreaktivität auf IgE- und T-Zell-Ebene zu dem Allergen Mala s 13 aus der hautbesiedelnden Hefe *Malassezia sympodialis* gezeigt. Während die IgE-Reaktivität

gegen Autoallergene das zentrale Phänomen der Autoallergie darstellt und daher am besten untersucht ist, sind Autoallergen-spezifische T-Zell-Antworten dagegen bisher nur für einige Autoallergene charakterisiert worden. Dabei zeichnet sich allerdings ab, dass Autoallergene möglicherweise ein anderes Immunprofil begünstigen als exogene Allergene: Während für letztere eine Th2-Antwort typisch ist, scheinen Autoallergene eine Th1-Antwort zu fördern. In dieser Arbeit sollten daher die intrinsischen immunmodulatorischen Effekte von Autoallergenen näher untersucht werden.

Eine mögliche Erklärung, warum Autoallergene die Toleranzmechanismen des Immunsystems außer Kraft setzen können, wäre die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Dendritische Zellen fungieren im Körper als eine Art Grenzkontrolle. Erkennen sie bestimmte, konservierte Muster auf anderen Zellen oder Molekülen, können sie von ihrem auf Toleranz eingestellten Grundmodus auf Entzündung umschalten und können so pro-inflammatorische Antworten des adaptiven Immunsystems initiieren. Wir konnten bereits zeigen, dass α -NAC (Hom s 2) ein starker Aktivator für Monozyten ist und IL-12-abhängig eine Th1-Antwort induziert (Hradetzky et al, 2013, J. Invest. Dermatol.). α -NAC bindet an Monozyten und stimuliert die Transkription und Sekretion von IL-6 und IL-12 p40 aus diesen Zellen. Da bekannt ist, dass einige Hitzeschock-Proteine und Chaperone als endogene Toll-like receptor(TLR)-Liganden fungieren, untersuchten wir diese Möglichkeit für α -NAC, das auch intrazellulär vorkommt und Chaperon-Funktion hat. Tatsächlich konnte durch Vorbehandlung von Monozyten mit blockierenden anti-TLR-2-Antikörpern die Freisetzung von IL-6 und IL-12 p40 auf die anschließende Stimulation mit α -NAC reduziert werden. Für das zweite untersuchte Autoallergen, hTrx, konnten wir keine Abhängigkeit von TLRs beobachten, jedoch ebenfalls eine starke Induktion von Zytokinen des angeborenen Immunsystems wie IL-6, IL-12 p40 und IL-23. Sowohl α -NAC als auch hTrx führten zur mRNA-Aufregulation des Inflammasom-Sensormoleküls NLRP3 (NOD-like receptory family, pyrin domain containing 3) sowie von IL-1 β und IL-18, d.h. von Zytokinen, die durch die Inflammasom-assoziierte Caspase-1 von der Pro-Form zur aktiven Form gespalten werden (Abb.1).

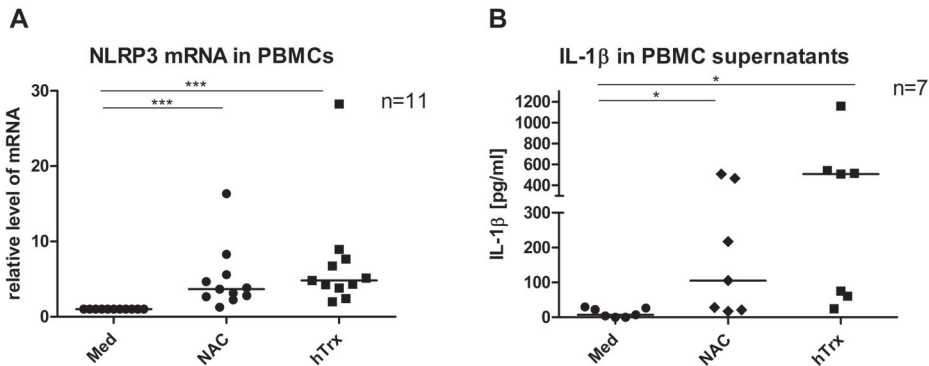


Abb. 1: α -NAC und hTrx aktivieren das NLRP3-Inflammasom A) PBMCs wurden mit α -NAC oder hTrx für 4 h stimuliert. Anschließend wurde die mRNA isoliert, cDNA synthetisiert und mittels RT-qPCR analysiert. NLRP3 mRNA-Level wurden auf entsprechenden GAPDH-Level normalisiert. * $p < 0.001$ B) PBMCs wurden mit α -NAC oder hTrx für 24 h stimuliert. Anschließend wurden Überstände abgenommen und im ELISA analysiert. * $p < 0.05$

Die Bedeutung der Monozyten für die Gesamtantwort auf α -NAC-Stimulation wird auch dadurch verdeutlicht, dass isolierte T-Zellen - im Vergleich zur PBMC-Fraktion, die auch Monozyten enthält - deutlich weniger IFN- γ sezernieren. Wurden isolierte CD4+ T-Zellen jedoch in Überständen dendritischer Zellen kultiviert, die mit α -NAC stimuliert worden waren, konnte eine Th1-, aber keine Th2-Antwort gemessen werden. Die Abhängigkeit der T-Zell-Antwort auf α -NAC von Monozyten konnte im Weiteren auch für die Zytokine IL-17 und IL-22 gezeigt werden (Hradetzky et al. 2014, J. Invest. Dermatol.). Die Freisetzung von T-Zell-Zytokinen war generell stärker, wenn zusätzlich zum α -NAC noch der T-Zell-Proliferationsfaktor IL-2 zugegeben wurde. Dies war auch die Bedingung, unter der die stärkste Phospho-

rylierung des Transkriptionsfaktors signal transducer and activator of transcription (STAT)3 beobachtet wurde. STAT3 ist essentiell für die Th17-Differenzierung, da es die Transkription des Th17-Schlüssel-Transkriptionsfaktors ROR- γ t reguliert und direkt an den IL-17-Promotor bindet. Wurde die STAT3-Phosphorylierung durch Behandlung der Zellen mit einem spezifischen Inhibitor verhindert, wurde auch die Freisetzung von T-Zell-Zytokinen durch α -NAC-stimulierte Zellen deutlich verringert.

Wurden die bisher genannten Zytokine sowohl in Immunzellen von Patienten mit AD als auch gesunden Kontrollen effizient induziert, gab es zwischen diesen Gruppen deutliche Unterschiede in der Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Auf Stimulation mit α -NAC waren in PBMC-Überständen α -NAC-sensibilisierter Patienten mit AD deutlich niedrigere Mengen an IL-10 zu messen als in PBMC-Überständen nicht-sensibilisierter Patienten oder gesunder Kontrollen (Abb. 2).

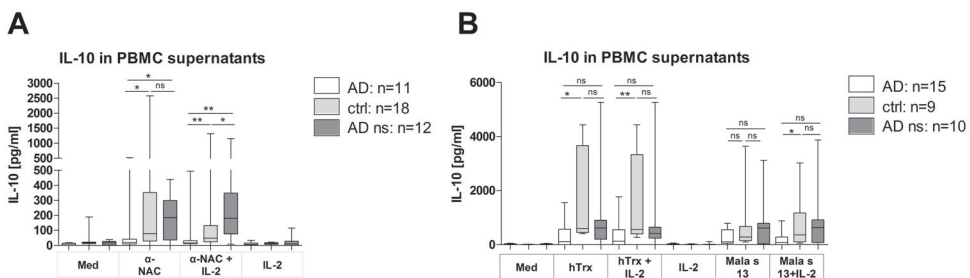


Abb. 2: PBMCs sensibilisierter Patienten mit AD setzen nach Stimulation mit Autoallergen weniger IL-10 frei A) PBMCs von α -NAC-sensibilisierten Patienten mit AD (AD), gesunden Kontrollspendern (ctrl) und nicht-sensibilisierten Patienten (AD ns) wurden mit α -NAC mit oder ohne IL-2 für 3 Tage stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-10 in den Kulturüberständen per ELISA gemessen (Abbildung nach: Hradetzky S, Rösner L, Balaji H, Heratizadeh A, Mittermann I, Valenta R, Werfel T: Cytokine effects induced by the human autoallergen α -NAC. *J Invest Dermatol.* 2014 Jan; 134(6):1570-8. B) PBMCs von Malassezia-sensibilisierten Patienten mit AD (AD), gesunden Kontrollspendern (ctrl) und nicht-sensibilisierten Patienten (AD ns) wurden mit hTrx oder Mala s 13 mit oder ohne IL-2 für 3 Tage stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-10 in den Kulturüberständen per ELISA gemessen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Abbildung nach: Hradetzky S, Roesner LM, Heratizadeh A, Cramer R, Garbani M, Scheynius A, Werfel T: Differential cytokine induction by the human skin-associated autoallergen thioredoxin in sensitized patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Dec 6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.038.)

Analog war dies auch bei Stimulation mit hTrx in PBMC-Überständen von Patienten zu beobachten, die auf hTrx sensibilisiert waren (Hradetzky et al. 2014, *J. Allergy Clin. Immunol.*). Diese eingeschränkte Fähigkeit zur IL-10-Induktion könnte ein Anzeichen des Toleranzverlusts in diesen Patienten sein. Wir untersuchten daraufhin, welche Zellen das IL-10 freisetzen und stellten fest, dass nicht CD4+ T-Zellen, sondern Monozyten die Hauptproduzenten dieses Zytokins waren. Da bekannt ist, dass Monozyten von atopischen Personen vermehrt Rezeptoren für IgE auf ihrer Oberfläche aufweisen können, und der von uns gemessene Effekt auf IL-10 vom Vorhandensein spezifischen IgEs abhängig war, untersuchten wir diesen Zusammenhang in weiteren Experimenten. Durch ein sogenanntes IgE-Stripping mit Lactatpuffer konnten wir die Menge an IgE-Molekülen auf der Oberfläche von Monozyten deutlich reduzieren. Eine anschließende Stimulation mit hTrx führte zu einer erhöhten Freisetzung von IL-10 im Vergleich zu Zellen ohne Lactatpuffer-Vorbehandlung, bei α -NAC war eine ähnliche Tendenz zu beobachten.

Während die durch α -NAC induzierten pro-inflammatorischen Zytokine IL-17, IL-22 und IFN- γ zur Apoptose oder verminderten Differenzierung von Keratinozyten führen und somit die Entzündungsreaktion der Haut verstärken oder deren Barrierefunktion schwächen können, kann die antigenspezifisch reduzierte IL-10-Freisetzung das Gleichgewicht der Immunantwort in sensibilisierten Patienten weiter in Richtung Pro-Inflammation verschieben. Interessanterweise wurde vor kurzem für exogene Allergene gezeigt, dass ein Bruch der antigenspezifischen Toleranz durch TLR-Stimulation und pro-inflammatorische Zytokine begünstigt wird. Da α -NAC Zellen des angeborenen Immunsystems über TLR-2 aktiviert und pro-inflammatorische Zytokine induziert, wäre dies eine mögliche Erklärung für die Autosensibilisierung auf dieses Molekül. Ähnliche Mechanismen wurden auch für andere Autoantigene beschrieben, die als danger-associated molecular pattern (DAMP) agieren oder als sogenannte pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-sensitizing molecules die Zellreaktivität auf mikrobielle pattern-recognition receptor (PRR)-Liganden steigern.

Die Aktivierung von Zellen über PRRs könnte erklären, warum auch in Immunzellen von nicht-sensibilisierten Spendern pro-inflammatorische Zytokine durch die Autoallergene α -NAC und hTrx induziert werden. Durch die starke Entzündungsreaktion könnten Toleranzmechanismen aufgehoben werden und im Zusammenspiel mit einer erhöhten Freisetzung von Autoallergenen aus gestressten oder nekrotischen Zellen in läsionaler Haut könnte eine Autosensibilisierung in Gang gesetzt werden. Durch die ausgelösten pro-inflammatorischen Immunantworten kann die Autoallergie eine vorhandene Entzündungsreaktion verstärken und somit zu einem Kreislauf aus Inflammation, Freisetzung und Immunreaktion auf die Autoallergene, und wiederum verstärkter Inflammation und Exazerbation der AD führen.

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.), Beteiligte Wissenschaftler der MHH: Hradetzky, Susanne (Dr. rer. nat.), Rösner, Lennart (Dr. rer. nat.), Heratizadeh, Annice (Dr. med.), Kopfnagel, Verena (Dr. rer. nat.), Zeitvogel, Jana (Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Valenta, Rudolf (Prof. Dr.), Medizinische Universität, Wien, Österreich; Cramer, Reto (Prof. Dr.), Universität Zürich, Davos, Schweiz; Scheynius, Annika (Prof. Dr.), Karolinska Institut, Stockholm, Schweden Kwok, William W. (Dr.), Benaroya Research Institute, Seattle, USA.; Förderung: DFG, Klinische Forschergruppe 250, Teilprojekt 6: WE1289/8-2, AOBJ: 605622

Weitere Forschungsprojekte

Weitere Projekte siehe Forschungsbericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie

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

KMU-Innovativ-10: Innovativer Therapieansatz mittels kombinatorischer Immunmodulation zur Behandlung der atopischen Dermatitis und anderer Ekzemkrankheiten

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: Sterna Biologicals GmbH Co. KG, BMFZ Marburg

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

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.); Kooperationspartner: Leibniz-Universität Hannover, Institut für Informationsverarbeitung; Hochschule Hannover, Fakultät 1 - Elektro- und Informationstechnik; Georg-August-Universität, Abteilung für Dermatologie, und Venerologie, Universitätsmedizin Göttingen; Hannoversches Zentrum für Optische Technologien; Lüllau Engineering GmbH, Lüneburg; Basys GmbH, Lüneburg; taberna pro medicum, Physik und Elektronik in der Medizintechnik GmbH, Lüneburg; Förderung: BMWi, Projektträger Aif/ZIM Berlin: KF 2117405FR1

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

■ Projektleitung: Werfel, Thomas (Prof. Dr. med.), Heratizadeh, Annice (Dr. med.); Kooperationspartner: Gieler, Uwe (Prof. Dr. med.), Justus-Liebig-Universität Gießen; Förderung: Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG)

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

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

In-vitro-Untersuchungen des Einflusses des IL-1 beta-Antagonisten Canakinumab auf die IL-22-Produktion von T-Zellen bei chronisch-entzündlichen Hautkrankheiten nach Stimulation mit Staphylokokkenexotoxinen

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

Originalpublikationen

Hier verweisen wir auf den Forschungsbericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie

Wissenschaftspreise

Hier verweisen wir auf den Forschungsbericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Hier verweisen wir auf den Forschungsbericht der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie