

**Expressionsmuster von Toll-like-Rezeptor-2,-4 und -9 auf  
Mononukleären Zellen und Dendritischen Zellen von  
symptomatischen, asymptomatischen Atopikern, Nicht-  
Atopikern und Psoriasis Patienten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Ulrike Barbara Sell

aus Aachen

2019

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dagmar von Bubnoff
2. Gutachter: PD Dr. med. dent. Moritz Kepschul

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.02.2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. Thomas Bieber

Dem Guten Gewissen



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
2.1 Das Immunsystem	10
2.1.1 Angeborenes Immunsystem .....	10
2.1.2 Adaptives Immunsystem.....	11
2.1.3 Monozyten .....	11
2.1.4 Dendritische Zellen.....	13
2.1.5 Die Rolle der T-Lymphozyten in der allergischen Atemwegsentzündung.....	15
2.1.6 Toll-Like-Rezeptor .....	17
2.2 Allergie und Atopie	22
2.2.1 Epidemiologie.....	23
2.2.2 Klinische Ausprägung und Therapie.....	24
2.3 Schuppenflechte (Psoriasis vulgaris)	25
2.3.1 Klinische Ausprägung und Therapie.....	26
2.4 Hygienehypothese	27
<b>3. Zielsetzung.....</b>	<b>29</b>
<b>4. Materialien und Methoden .....</b>	<b>31</b>
4.1 Materialien	31
4.1.1 Geräte .....	31
4.1.2 Chemikalien.....	32
4.1.3 Medien.....	33
4.1.4 Cytokine.....	34
4.1.5 Antikörper .....	34
4.1.6 Lösungen.....	34
4.2 Methoden	35
4.2.1 Probanden .....	35
4.2.2 Radio-Allergo-Sorbens-Test (RAST) .....	36
4.2.3 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes .....	36

4.2.4	Durchflusszytometrische Messung von Oberflächenantigenen auf Monozyten...	37
4.2.5	Kultivierung von Dendritischen Zellen .....	38
4.2.6	RNA Extraktion aus Monozyten und gereiften DCs .....	38
4.2.7	Reverse Transkription .....	39
4.2.8	Real-Time Amplifikation mittels TaqMan™-PCR-Technologie .....	40
4.2.9	Statistische Auswertung .....	41
4.3	Patienten und Kontrollgruppen	42
4.3.1	Auswertung des Fragebogens.....	43
4.4	Gesamt-IgE und spezifisches IgE	47
4.5	Reinheit der Zellen	51
4.6	Expressionsmuster von TLR-2, -4, -9	54
4.6.1	Toll-like-Rezeptor-2 .....	54
4.6.2	Toll-like Rezeptor-4 .....	57
4.6.3	Toll-like Rezeptor-9 .....	58
4.6.4	Veränderung der TLR-Expressionsmuster während der Differenzierung zu Dendritischen Zellen.....	61
4.7	Korrelation des Gesamt-IgE-Levels im Serum und der TLR Expression	64
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
5.1	Diskussion der Methodik	67
5.1.1	Real-Time PCR-System zur Untersuchung der Expression der Toll-like- Rezeptoren.....	67
5.1.2	Eignung des ausgewählten Referenzgens .....	68
5.2	Diskussion der Ergebnisse	68
5.2.1	Immunmodulierendes Potential der TLR .....	69
5.2.2	TLR Expressionsmuster .....	70
5.2.3	Korrelation von spezifischem IgE und TLR-2 Expression.....	76
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
7.1	Anhang	80
7.2	Tabellenverzeichnis	84
7.3	Abbildungsverzeichnis	84

8. Literaturverzeichnis ..... 86

## 1. Abkürzungsverzeichnis

AA	Asymptomatische Atopiker
APC	Antigen-präsentierende Zellen
CD	Cluster of differentiation
DC	Dendritische Zellen
ELISA	Enzyme-linked-immun-stimulated-Assay
FACS	<u>F</u> lourescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
FcεRI	hoch affiner Rezeptor für IgE
FSC	forward light scatter
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HLA	Human leukocyte antigen
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IRAK	Interleucin-receptor associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
ISS	Immunstimulatorische Sequenz
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine-rich repeats
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
NA	Nicht-Atopiker
NF- κB	Nuclear-factor kappa B
P	Psoriasis vulgaris
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
PRR	pattern-recognition receptor
RAST	Radio-allergen-sorbent-test
RNA	Ribo-Nucleotid-Acid
RT-PCR	Real-Time-Polymerase-Chainreaction
SA	Symptomatische Atopiker
SNP	single nucleotid polymorphism

SR	Scavanger Rezeptor
SSC	sideward light scatter
Th1-Zellen	T-Helferlymphozyten der Klasse 1
Th2-Zellen	T-Helferlymphozyten der Klasse 2
TIRAP	TIR-domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$

## 2. Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper kommt über seine Umwelt ständig in Kontakt mit Krankheitserregern und Körperfremdenmaterial. Um eine Unterscheidung zwischen Körpereigenem und Körperfremdem vorzunehmen, hat sich das Immunsystem entwickelt. Neben der Erkennung von schädlichem Material besteht seine Aufgabe aber auch in der Barriere gegen Pathogene und Eliminierung derselben. Die größte Barriere bildet die Haut, aber auch der Aerodigestiv- und Gastrointestinal-Trakt sind mit spezialisierter immunkompetenter Mukosa ausgekleidet. Hier verzahnen sich die zwei Hauptkomponenten der Abwehr, das angeborene und das adaptive Immunsystem (Akira et al., 2006).

#### 2.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist ein evolutionär konserviertes System, das die erste Barriere gegen die Invasion von Pathogenen darstellt. Dies erfolgt durch die Aktivierung von Phagozyten (unter anderem Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und Granulozyten) (Akira et al., 2006). Der Kontakt mit einem Erreger oder potentiellm Antigen löst eine Ausschüttung von Zytokinen aus, die zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion und Chemoattraktion weiterer Immunzellen führt. Zudem findet über Antigenpräsentation und Chemoattraktion eine Verzahnung mit dem adaptiven Immunsystem statt. Eine entscheidende Rolle spielen Toll-like-Rezeptoren (TLR) (s. Kap. 2.1.6), die sowohl über eine Oberflächenexpression von mikrobiellen Produkten zur Reifung von Dendritischen Zellen (DCs), als auch zur Auslösung einer effektiven, adaptiven Immunantwort beitragen (Alexopoulou et al., 2001a). Bereits 1989 wurde von Janeway postuliert, dass auch das angeborene Immunsystem *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) über sogenannte *pattern-recognition receptors* (PRRs) erkennen und von wirtseigenen Molekülen unterscheiden kann (Kawai und Akira, 2009). PRRs erkennen mikrobielle Produkte, die essentiell für das Überleben des Mikroorganismus sind und somit kaum einer Veränderung unterliegen. Außerdem werden PRRs keimbahncodiert und sind unabhängig vom immunologischen Gedächtnis (Akira et al., 2006). Die zugrundeliegenden Aktivierungswege werden im Abschnitt 2.1.6 erläutert.

### 2.1.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird in der deutschsprachigen Literatur auch als erworbenes Immunsystem bezeichnet, da es für die sehr spezifische und hocheffektive Immunantwort verantwortlich ist. Es handelt sich hierbei um eine zellvermittelte Immunantwort, die durch Lymphozyten, der Untergruppen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, geprägt ist. Diese werden in weitere Subgruppen unterteilt und entsprechend ihrer Funktion benannt. Man unterscheidet T-Helferzellen (Th), T-Killerzellen oder regulatorische T-Zellen (Treg), welche eine wichtige Rolle in der zellvermittelten Zytotoxizität, der Steuerung der humoralen Immunantwort und einer allergischen Reaktion spielen (Janeway Jr.CA, 2001). Die T-Lymphozyten lassen sich auf Grund ihrer Funktion und der Expression von Korezeptoren (CD=Cluster of Differentiation) in 2 Typen einteilen: CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische T-Helfer-zellen. Erstere erkennen Antigene auf MHC-Klasse-II Molekülen (Major-Histocompatibility-Complex) und können Makrophagen und B-Zellen aktivieren (Abbas et al., 1996). Die zytotoxischen CD8+ T-Helferzellen erkennen von MHC-Klasse-I präsentierte Antigene und können die so identifizierten Zellen z.B. über die Ausschüttung von Perforinen und Granenzymen direkt abtöten (Whitton und Zhang, 1995). Innerhalb der CD4- und CD8- Subpopulation können weitere Untergruppen anhand der Zytokin-produktion eingeteilt werden. So produzieren sogenannte Th1-Zellen vor allem Interferon- $\gamma$ , Interleukin (IL)-12, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Perforine und Granenzymes (Chodisetti et al., 2014), welche die zelluläre Immunität stärken, während Th2-Zellen IL-4 und IL-5 freisetzen, die wesentliche Faktoren für IgE-Produktion und Eosinophilie sind (Lou et al., 2014).

Die B-Lymphozyten sind zum einen Träger der humoralen Immunantwort, in dem sie durch klonale Selektion Antigen-spezifische Antikörper produzieren. Diese markieren Antigene für die Phagozyten und tragen somit zur Erregerelimination bei. Zum anderen differenzieren sie sich zu B-Gedächtniszellen und machen eine lange, zum Teil lebenslange, Immunität gegen erkannte Pathogene möglich (Janeway Jr.CA, 2002).

### 2.1.3 Monozyten

Monozyten (MC) gehören zu den phagozytierenden Zellen und sind somit Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Zellen über myeloide Vorläuferzellen im Knochenmark, dem sogenannten retikuloendotheliale System, bevor sie für wenige Stunden oder Tage im Blut zirkulieren (Volkman und GOWANS, 1965). Von dort aus emigrieren sie in das Gewebe und

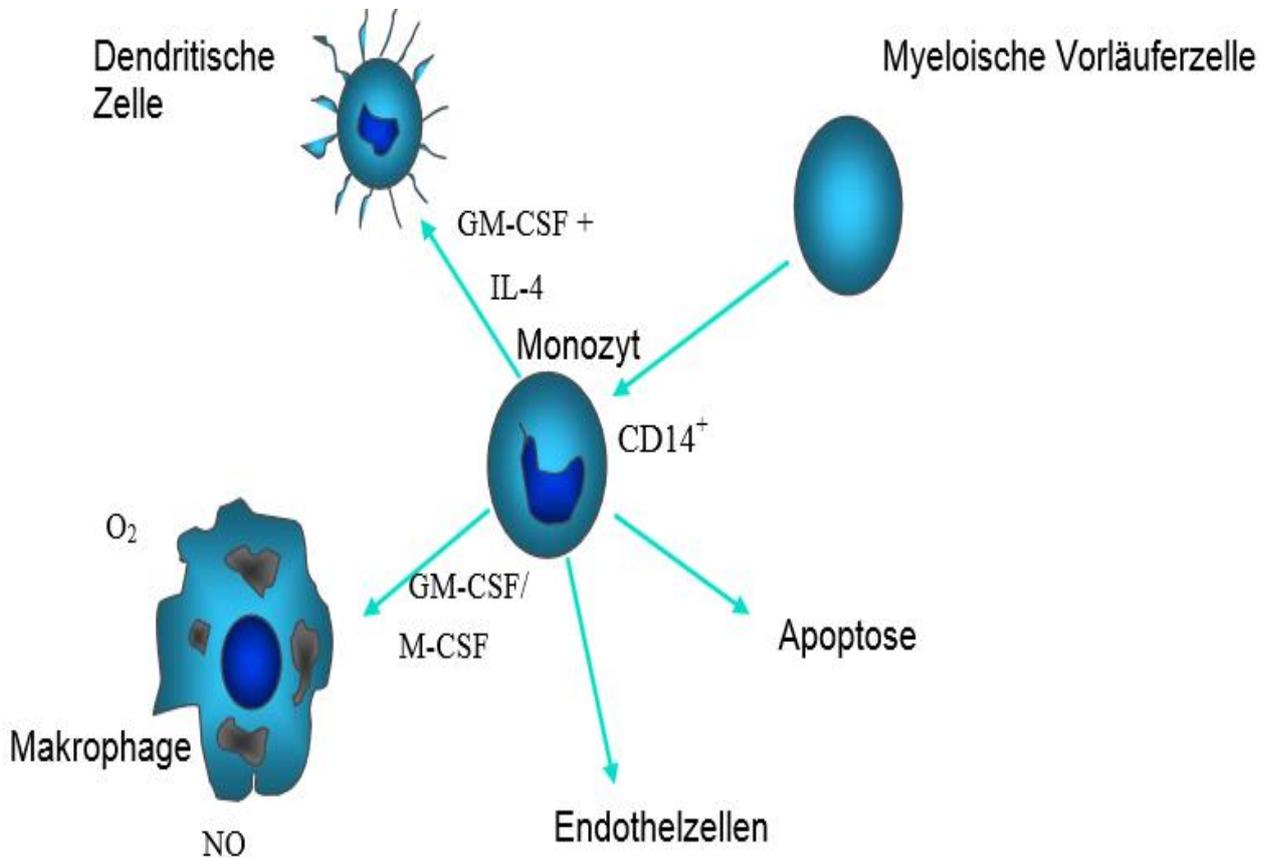
entwickeln sich zu Makrophagen. Im Rahmen einer entzündlichen Reaktion werden u. a. chemotaktische Moleküle gebildet, die die Einwanderung von zirkulierenden Monozyten in das betroffene Gewebe induzieren (van Furth et al., 1973). Die nicht differenzierten, zirkulierenden Monozyten entwickeln sich gewebeabhängig zu reifen Makrophagen mit charakteristischen morphologischen und funktionellen Eigenschaften. Hierbei scheint die Heterogenität der Monozyten eine große Rolle zu spielen, um eine Spezialisierung in Abhängigkeit der anatomischen Lokalisation zu erreichen. Beispiele hierfür sind die Fähigkeit von Osteoklasten Knochen abzubauen (Quinn und Gillespie, 2005) und die Produktion von biologisch aktiven Substanzen, wie TNF, IL-1, Prostaglandin E2 (PGE2) und Komplementfaktoren (Nathan, 1987), die immunologische Prozesse nachhaltig beeinflussen. Ebenso sind Makrophagen in der Lage nach einer Inflammation den status quo ante im Gewebe wiederherzustellen und über die Expression von PRRs oder Scavenger Receptors (SR) ein Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem zu werden (Gordon und Taylor, 2005).

Die im Blut vorkommenden Monozyten zeigen eine morphologische Heterogenität, z.B. bezüglich ihrer Größe, der Granularität und der Zellkernmorphologie (Passlick et al., 1989). Dies führt zu der Frage, ob die verschiedenen Untergruppen auch zu einer unterschiedlichen Funktionalität der Monozyten führen. Über die unterschiedliche Expression von CD14 und CD16 (FcεRIII) lassen sich Monozyten in zwei Untergruppen einteilen: die klassischen CD14+/CD16- und die CD14+/CD16+ (Passlick et al., 1989). Auch wenn die CD14+/CD16+ Monozyten viele Gemeinsamkeiten mit den klassischen Monozyten (ca. 90 % im Blut) aufweisen, unterscheiden sie sich durch eine erhöhte Expression von Klasse-II-Antigen und FcεRII (CD 32), was zu einem funktionellen Unterschied führt (Ziegler-Heitbrock, 2007). Beide Untergruppen sind in der Lage sich in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 zu DCs zu differenzieren (Sallusto und Lanzavecchia, 1994a), wobei die CD14+/CD16+ Monozyten bevorzugt ins Gewebe migrieren und zu DCs differenzieren (Randolph et al., 2002).

### **2.1.3.1 Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen**

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich zumindest ein Teil der Dendritischen Zellen (DCs) aus Monozyten ableitet. Hierbei scheint die Oberflächenexpression von CD2 eine große Rolle bei der Differenzierung zu spielen (Crawford et al., 1999; Yang et al., 1999; Zhou und Tedder, 1996). Das Kulturmilieu der Monozyten beeinflusst ihre Reifung. Inkubiert man Monozyten mit dem Makrophagen-Wachstumsfaktor (M-CSF),

differenzieren sie sich zu Makrophagen (Hashimoto et al., 1997), inkubiert man sie hingegen mit Granulozyten-Makrophagen-Wachstumsfaktor (GM-CSF) und IL-4 entwickeln sich DCs (Bender et al., 1996).



**Abb. 1: Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen (Markert, 2006).** Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich CD14<sup>+</sup>-Monozyten aus myeloischen Vorläuferzellen entwickeln. Diese entwickeln sich dann unter dem Einfluss von GM-CSF und Interleukin 4 zur Dendritischen Zellen oder im Milieu mit GM-CSF und M-CSF zu Makrophagen. Wenn die CD14<sup>+</sup>-Monozyten keine Stimulation von Interleukinen oder Wachstumsfaktoren erfahren, gehen die Zellen in die Apoptose über. Auch Endothelzellen können sich aus den CD14<sup>+</sup>-Monozyten differenzieren und aus dem Blut in das Gefäßsystem migrieren.

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor CD: Cluster of differentiation, NO: Stickstoff, O<sub>2</sub>: Sauerstoff

#### 2.1.4 Dendritische Zellen

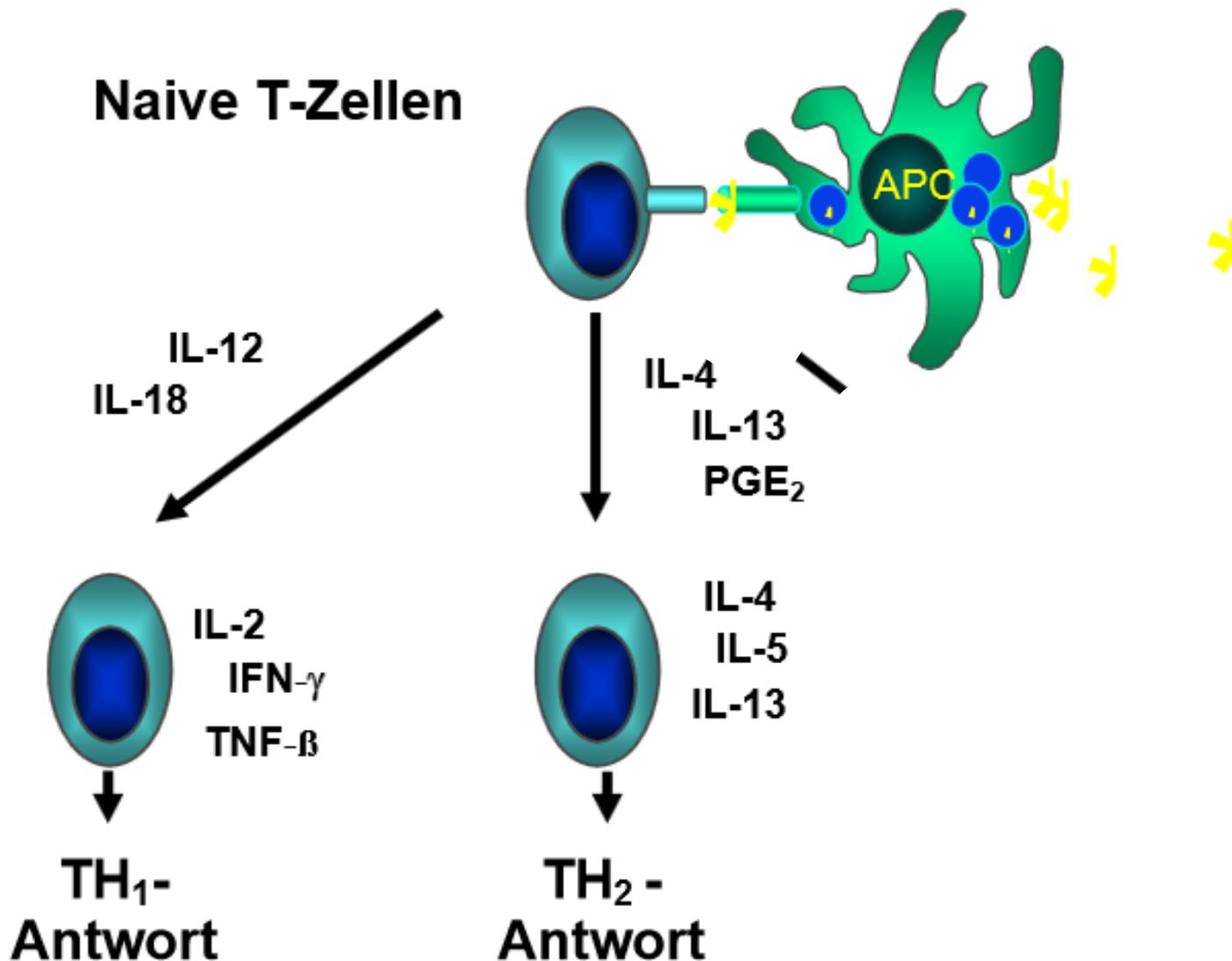
Die 1973 erstmal von Steinman et al. beschriebenen Dendritischen Zellen (DCs) gehören zu den potentesten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems. DCs sind spezialisiert durch Aufnahme von Antigenen im Gewebe, Migration zu lymphoidem

Gewebe und Aktivierung von antigen-abhängigen T-Zellen eine Immunantwort zu modulieren (Steinman et al., 1975; Steinman, 1991). DCs kommen im ganzen Körper vor, wo es zum Antigenkontakt kommt, vor allem in der Haut (Langerhans-Zellen), den lymphatischen Organen (Milz, Thymus, Lymphknoten) und in den Schleimhäuten. Der größte Teil der DCs leitet sich von den myeloiden Vorläuferzellen ab, z. B. den Monozyten. Nur ein kleiner Teil (die plasmazoiden DCs) hat lymphoide Herkunft. Mit Hilfe eines geeigneten Zytokinmilieus ist es möglich, DCs aus Monozyten oder CD34+-Progenitorzellen in vitro zu generieren (Sallusto und Lanzavecchia, 1994b; Romani et al., 1996). Präkursoren DCs zirkulieren im Blut, sammeln die Antigene der Umwelt und exprimieren zu diesem Zeitpunkt nur wenige kostimulatorische Moleküle (CD80, CD83, CD86, MHC-II), weisen jedoch eine starke Endozytosefähigkeit und Antigenverarbeitung auf. Nach der Antigenaufnahme wandern die DCs in die regionären Lymphknoten und differenzieren sich zu reifen DCs, die eine verminderte Phagozytosefähigkeit und eine erhöhte Expression von MHC-I/II und verschiedenen kostimulatorischen Molekülen aufweisen. Sie sind damit zur Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung in der Lage (von Bubnoff et al., 2001). Während der Reifung der DCs findet man eine Expression von CD1a auf ihrer Oberfläche, ein Marker für noch unreife Zellen. CD83 und CD208 (Lysosomen-assoziiertes Membranglykoprotein) hingegen charakterisieren die reifen Formen (Ebner et al., 2002). Die Migration und Reifung wird von bestimmten Signalen induziert, wie z.B. der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus entzündlichem Gewebe oder virale DNS oder bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Während unreife DCs eine niedrige IL-10-Produktion aufweisen, sezernieren DCs nach der Stimulation viel IL-10 (Corinti et al., 2001). Entsprechend sezernieren reife DCs weniger IL-12 (Reider et al., 2002). Legge et al. (Legge et al., 2002) teilte die DCs analog der Monozyteneinteilung in CD8 negative (DC2) und CD8 positive (DC1) DCs ein und ordnete ihnen jeweils charakteristische Zytokine, IL-10 und IL-12, zu. Nach Tanaka et al. (Tanaka et al., 2000) aktivieren DC1 (myeloide DCs) Th1-Zellen durch die Produktion von IL-12 und IFN- $\gamma$  und DC2 (lymphoide DCs) Th2-Zellen durch Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 (Leung, 2000; Maldonado-Lopez et al., 1999; Rissoan et al., 1999). In einigen Studien hat sich ebenfalls gezeigt, dass die Einteilung in DC1 und DC2 nicht unbedingt in einer Th1- und Th2-Aktivierung resultiert, sondern dass DC1 sowohl Th1- als auch Th2-Zellen aktivieren können (von Bubnoff et al., 2001).

### 2.1.5 Die Rolle der T-Lymphozyten in der allergischen Atemwegsentzündung

Bei der Sensibilisierung gegen ein inhaliertes Allergen spielt das Atemwegsepithel eine entscheidende Rolle (Lambrecht und Hammad, 2012b). Epithelzellen erkennen durch *pattern-recognition-receptors* (PRR), wie TLRs, pathogenassoziierte molekulare Muster. Lipopolysaccharide, die z.B. im Hausstaubmilbenextrakt enthalten sind, binden an TLR-4 und aktivieren durch den Nuclear-factor kappa B (NF- $\kappa$ B) viele proinflammatorische Gene (Hammad et al., 2009). So produzierte Chemokine und Zytokine, wie GM-CSF, IL-25 und IL-33 locken DCs an (Rank et al., 2009; Angkasekwinai et al., 2007), die das Allergen aufnehmen, prozessieren und es in den drainierenden Lymphknoten gegenüber naiven T-Zellen präsentieren. Je nach Zusammensetzung der von den DCs freigesetzten Zytokinen, wird eine Polarisierung der T-Helferzellen induziert (Lambrecht und Hammad, 2012a). In den meisten Fällen resultiert eine Differenzierung zu Th2-Zellen, welche den Isotypenwechsel zur IgE Produktion in B-Lymphozyten hervorrufen. Atopie wird vermutlich durch ein Ungleichgewicht einer Th1- und Th2-Zellantwort hervorgerufen (Gupta und Agrawal, 2010). Bei Inhalation von Allergenen werden Th2-Zellen in die Atemwege gelockt, proliferieren und produzieren die Effektorzytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Cohn et al., 1997). Diese von Th2-Zellen sezernierten Zytokine regen die IgE-Synthese durch B-Lymphozyten an. IL-4 fördert weiterhin die Proliferation der Th2-Zellen und Homöostase der Mastzellen. Das IL-13 verstärkt die Mukusproduktion und die Atemwegshyperreagibilität (Taubе et al., 2002). IL-5 induziert die Reifung von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark und fördert deren Rekrutierung (Foster et al., 1996). Für die Differenzierung der Th1-Zellen sind das proinflammatorische IL-12 und der Transkriptionsfaktor T-box 21 (T-bet) essentiell. Th1-Zellen können durch die T-bet-anhängige Induktion von Tumornekrose-Faktor  $\gamma$  (TFN- $\gamma$ ) die Genexpression von IL-4 und somit die Differenzierung zu Th2-Zellen inhibieren (Boom et al., 1988; Djuretic et al., 2007). Th2-Zellen können wiederum durch das regulatorische IL-10 die Th1-Antwort unterdrücken (Mosmann und Moore, 1991; Neurath et al., 2002). Durch diese gegenseitige Regulation wird angenommen, dass ein Gleichgewicht zwischen den Th1-Zellen und Th2-Zellen für die Immunhomöostase entscheidend ist. Dieser Hypothese nach ist eine Th2-vermittelte allergische Reaktion die Folge einer zu schwachen Gegenreaktion der Th1-Zellen. Eine Stärkung der Th1-Antwort würde die Balance wieder ausgleichen. Jedoch ist diese Th1/Th2-Hypothese umstritten, da im Mausmodell gezeigt werden

konnte, dass Th1-Zellen zur Sensibilisierung und Atemwegshyperreagibilität beitragen können (Randolph et al., 1999).



**Abb. 2: Th1 und Th2 Immunantwort nach Mosmann 1989 (Markert, 2006).**

Die Abbildung beschreibt die Differenzierung naiver T-Zellen nach Antigenpräsentation durch Antigen-Präsentierende Zellen (APC). Je nach Zusammensetzung der freigesetzten Zytokinen, wird eine Polarisierung der T-Helferzellen induziert (Lambrecht und Hammad, 2012a). So begünstigt das proinflammatorische IL-12 und IL-18 die Differenzierung der naiven T-Zellen zu Th1-Zellen, während IL-4, IL-13 und PGE<sub>2</sub> eine Differenzierung zu Th2-Zellen bewirkt. Die Th1- und Th2-Zellen produzieren wiederum ihrerseits spezifische Interleukine, die charakteristisch für eine spezifische Immunantwort sind. Charakteristische Interleukine der Th1- Antwort sind IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$ , während die Th2-Antwort durch IL-4, IL-5, IL-13 geprägt ist.

APC: Antigen Präsentierende Zelle, IL: Interleukin, PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E<sub>2</sub>, IFN- $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ , TNF- $\beta$ : Tumor Nekrose Faktor  $\beta$ , Th: T-Helferzelle

### 2.1.6 Toll-Like-Rezeptor

Die so genannten "Toll-like-Rezeptoren" (TLR) sind ausschlaggebender Bestandteil einer sehr ursprünglichen und konstanten Immunabwehr. Toll, der Ursprung der TLR-Familie, galt zunächst als wichtiger Faktor in der embryonalen Entwicklung der Drosophila Fliege (Anderson et al., 1985), später konnte gezeigt werden, dass er auch in der Abwehr gegen Pilzinfektionen eine wichtige Rolle spielt (Lemaitre et al., 1996), und schließlich scheinen TLRs eine bedeutsame Rolle in der Detektion von mikrobiellen Produkten und Initiierung einer Immunantwort, sowohl in Drosophila als auch bei Säugern, zu spielen (Anderson, 2000). Bisher sind zwölf Mitglieder der TLR-Familie genauer charakterisiert (vgl. Tabelle 1). Sie bestehen aus glykoproteinreichen Transmembranproteinen und werden extra- oder intrazellulär exprimiert. Die intrazellulären TLR sind meist endosomal lokalisiert, was bedeutet, dass Liganden, bzw. so genannte PAMPs zunächst endosomal aufgenommen werden müssen bevor eine Signaltransduktion möglich ist. Sie werden von verschiedenen Zellen, darunter Makrophagen und Dendritischen Zellen, aber auch B-Zellen, Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert (Akira et al., 2006).

**Tab. 1:** Toll-like-Rezeptoren und ausgewählte Liganden nach (Akira et al., 2006)

Rezeptor	Ligand	Lokalisation
TLR 1/2	Triacylierte Lipopeptide (Bakterien/Mykobakterien)	Oberfläche
TLR 2/6	Diacylierte Lipopeptide, Peptidoglykan, Hitzeschockproteine, Lipoteichonsäure, Lipopolysaccharide (LPS)	Oberfläche
TLR 3	Doppelstrang RNA (dsRNA)	Endosome
TLR 4	LPS, Envelope Protein (Virus), Taxol, Fibrinogen	Oberfläche
TLR 5	Flagellin	Oberfläche
TLR 7	Imidazoquinoline, Loxoribin, ssRNA	Endosome
TLR 8	Einzelstrang RNA (ssRNA)	Endosome
TLR 9	Unmethylierte CpG-DNA (Bakterien, Mykobakterien), ssDNA (Viren)	Endosome
TLR 10	kein spezifischer Ligand (Oosting et al., 2014)	Oberfläche
TLR 11	Uropathogene Bakterien, Profilin (Toxoplasma gondii)	Oberfläche

TLRs können anhand ihrer Liganden oder der Lokalisation in Untergruppen zusammengefasst werden. Während TLR-1, TLR-2 und TLR-6 Fette erkennen, sind TLR-7, TLR-8 und TLR-9 auf die Erkennung von Nukleinsäuren spezialisiert. Der TLR-4 hingegen weist ein divergentes Ligandenspektrum auf, wie Lipopolysaccharide (LPS), Paclitaxel, das Fusionsprotein des *respiratory syncytial virus* (RSV), Fibronectin und Hitzeschockproteine. TLR-1, -2, -4, -5, -6, -10, -11 sind auf der Zelloberfläche exprimiert, während TLR-3, -7, -8, -9 fast ausschließlich in Endosomen lokalisiert sind, wo sie in Kontakt mit ihren Liganden kommen. Die transmembranären und membran-nahen Regionen sind ausschlaggebend für die Kompartimentierung (Akira et al., 2006). Der TLR-2 liegt als Heterodimer entweder mit TLR-1 oder TLR-6 vor (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002). TLR-4 bildet Homodimere und liegt in Verbindung mit dem Lymphozyten Antigen 96 (MD-2) vor, welches essentiell für die Reaktion auf LPS ist (Nagai et al., 2002; Shimazu et al., 1999). Der Kontakt zu den jeweiligen Liganden führt zur Auslösung einer intrazellulären Kaskade.

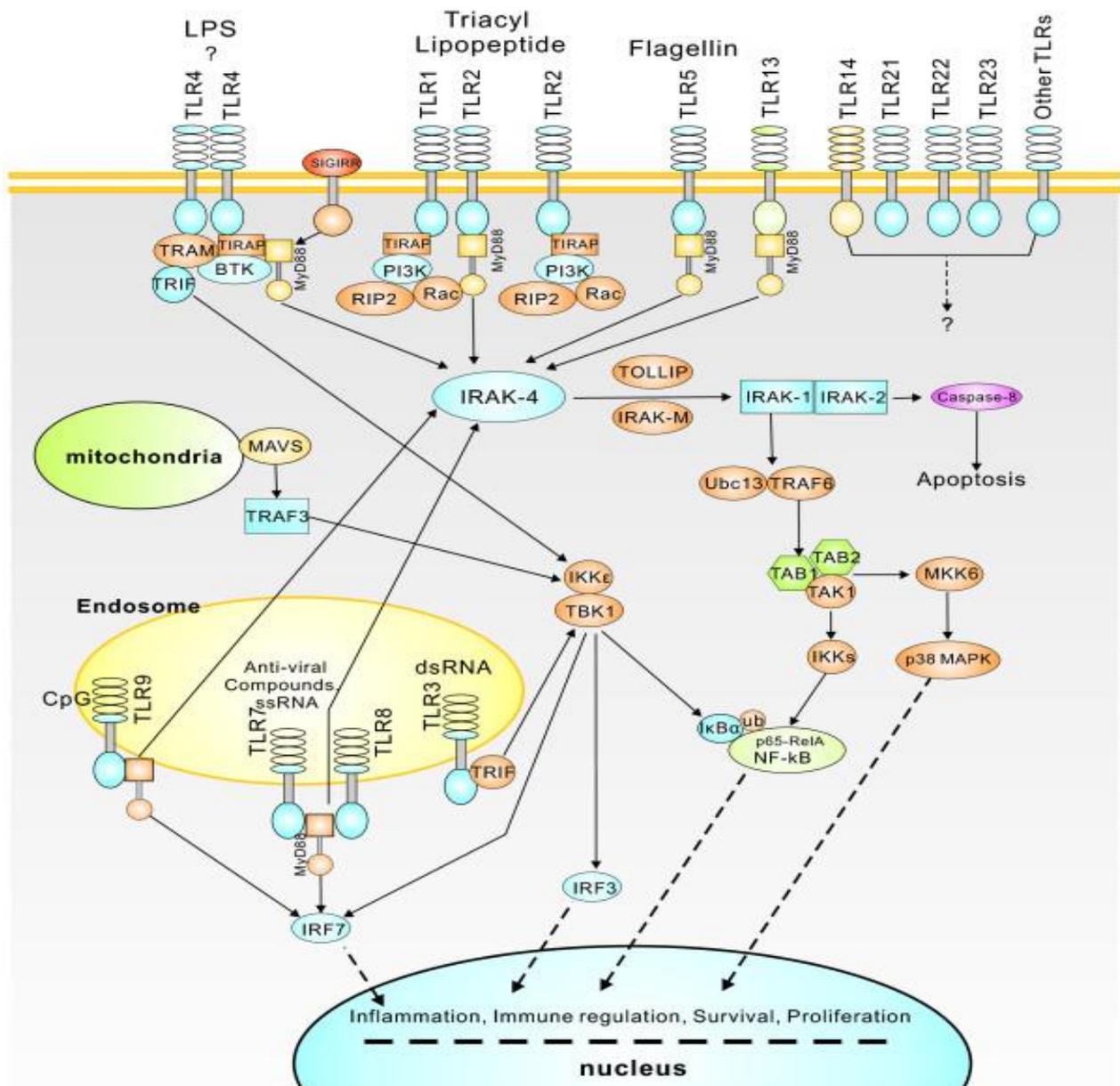
### **2.1.6.1 Informationsübertragung über die Toll-like-Signalkaskade**

Transmembranproteine verfügen über eine extrazelluläre Domäne und eine zytoplasmatische Region, über die eine Signalübertragung von der Außenseite der Zelle ins Innere stattfindet. Bei den TLRs besteht die extrazelluläre Domäne, wie beim Toll-Protein der *Drosophila*, aus repetitiven Leucin-reichen Einheiten (*leucine-rich repeats*, LRR). Die zytoplasmatische Region ist homolog zu der Signalübertragung des Interleukin-1-Rezeptors und wird Toll/IL-1R-Homologie-Domäne (TIR-Domäne) genannt (Bowie und O'Neill, 2000).

Durch Stimulation der Zelle mit einem TLR-Liganden startet die Signaltransduktion (Abb.3) durch die Bindung eines Adapterproteins, wie der myeloide Differenzierungsfaktor 88 (MyD88), an die cytoplasmatische TIR-Domäne und triggert eine Signalkaskade, die zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt (Akira et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Reaktion auf LPS (Kawai et al., 1999), als auch die Zellaktivierung durch TLR-2-Liganden von MyD88 abhängen (Takeuchi et al., 2000b; Takeuchi et al., 2000a). Weitere Adapterproteine sind das TIR-Domäne enthaltende Adapterprotein (TIRAP) (Horng et al., 2001) und das Toll-Rezeptor assoziierte Molekül (TRAM) (Yamamoto et al., 2003). Über den TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 6 (TRAF6) (Lomaga et al., 1999) und verschiedene IL-Rezeptor

assoziierte Kinasen (IRAK) wird das Signal intrazellulär vermittelt, was zu der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern und der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führt (Wang et al., 2001).

Abgesehen von TLR-3 vermitteln alle TLRs ihr Signal über den MyD88-abhängigen Weg. Ein weiterer Signalweg wurde bei MyD88-knock-out-Mäusen durch doppelsträngige Virus-RNA über TLR-3 und LPS über TLR-4 initiiert (Doyle et al., 2002; Kawai et al., 2001). Dieser Mechanismus ist MyD88 unabhängig und verläuft über TRAM und den TLR-assoziierten Aktivator von Interferon (TRIF) (Takeda und Akira, 2004). Er führt über IRF-3 (Interferon regulatory factor) zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Produktion (Alexopoulou et al., 2001b).



**Abb. 3: Signalkaskade der Toll-like-Rezeptoren nach (Xiang et al., 2010).**

Die Signaltransduktion startet durch die Bindung eines Adapterproteins an die TIR-Domäne, wobei der myeloide Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) ein zentrales Adapterprotein ist. Weitere Adapterproteine sind das TIR-Domäne enthaltende Adapterprotein (TIRAP) (Horng et al., 2001) und das Toll-Rezeptor assoziierte Molekül (TRAM) (Yamamoto et al., 2003). Über den TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 6 (TRAF6) (Lomaga et al., 1999) und verschiedene IL-Rezeptor assoziierte Kinasen (IRAK) wird das Signal intrazellulär vermittelt, was zu der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern und der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führt (Wang et al., 2001). Abgesehen von TLR-3 vermitteln alle TLRs ihr Signal über den MyD88-abhängigen Weg. Die Bindung von ds RNA an den TLR-3 ist MyD88 unabhängig und verläuft über TRAM und den TLR-assoziierten Aktivator von Interferon (TRIF) (Takeda und Akira, 2004). Er führt über IRF-3 (Interferon regulatory factor) zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Produktion (Alexopoulou et al., 2001b).

### 2.1.6.2 Regulation der TLR-Expression

Studien konnten zeigen, dass die Stimulation von Immunzellen mit PAMPs eine Veränderung der TLR-Expression bewirkt. So regulieren zum Beispiel humane B-Lymphozyten und DCs nach Stimulation mit synthetischen Oligonukleotiden die Expression von TLR-9 herunter und Mukosazellen nach Simulation mit LPS die Expression von TLR-4 herauf (Tulic et al., 2004b; Hornung et al., 2002a). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Enterotoxin B und Peptidoglykan-Fragmente, durch eine fast regelhafte Kolonisierung mit *Staphylococcus aureus*, an TLR-2 auf Monozyten und DCs binden und somit die Aktivierung von immunmodulatorischen und proinflammatorischen Effektorzellen beeinflussen (Volz et al., 2010). Diese proinflammatorischen Zytokine induzieren wiederum die Expression von TLR-2 (Matsuguchi et al., 2000; Mita et al., 2001). Dies konnte ebenfalls anhand von Daten über gesteigerte TLR-2-Level auf mRNA- und Proteinebene bei einer Infektion oder Sepsis durch *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden (Armstrong et al., 2004; Bode et al., 2014). Der TLR-4 scheint bislang der stärkste Vertreter in der Erkennung von gram-negativen Bakterien zu sein (Mita et al., 2002). Aber nicht nur Liganden verändern das Expressionsmuster, sondern auch das umgebende Zytokin-Milieu hat einen Einfluss. IL-2, ist ein von Th1-Zellen produziertes Zytokin, das die Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektorzellen auslöst und zu einem Anstieg der TLR-4-Expression auf Monozyten führt, während sich keine Expressionssteigerung auf B-Zellen nachweisen lässt (Mita et al., 2002). IFN- $\gamma$ , von Th1-Zellen gebildet, induziert in Monozyten den Anstieg der Expression der TLR-2 und -4 auf mRNA und Proteinniveau (Matsuguchi et al., 2000; Mita et al., 2001). Im Gegensatz hierzu senkt IL-4 die TLR-4 Oberflächenexpression auf Monozyten, aber steigert die TLR-4 Oberflächenexpression auf peripheren B-Zellen. Diese Resultate verdeutlichen, dass Th1-Zytokine, wie IL-2, verantwortliche Rezeptoren für eine Immunantwort auf gramnegative Bakterien durch Monozyten steigert. Wohingegen Th2-Zytokine, wie IL-4, die humorale B-Zell-Antwort auf gramnegative Bakterien steigert, jedoch nicht durch Monozyten (Mita et al., 2002; Staeger et al., 2000).

### 2.1.6.3 Dendritische Zellen als Bindeglied zwischen adaptiver und angeborener Immunität

Die Haut und die Schleimhäute haben ständig Kontakt zu unterschiedlichen Mikroorganismen. Adaptive und angeborene Immunität schützen den Organismus jedoch vor dem Eindringen dieser Mikroorganismen. Spezialisierte „Wächterzellen“, wie DCs, siedeln sich

vorwiegend an Orten vermehrter Pathogenexposition an und beeinflussen maßgeblich den weiteren Verlauf einer Infektion. DCs sind in der Lage, zwischen verschiedenen Mikroorganismen zu unterscheiden und eine maßgeschneiderte antimikrobielle Immunantwort zu initiieren. Auf der anderen Seite können Pathogene jedoch auch mit der Funktion der DCs interferieren und damit ihre Elimination verzögern oder verhindern (Kolb-Mäurer A., 2004).

Die Signal-übertragenden PPR beinhalten die Familie der TLR. Die DCs exprimieren sowohl TLR als auch endozytische Scavenger Rezeptoren (SR). Die angeborene Immunität vermittelt innerhalb weniger Stunden die Zerstörung und Phagozytose von Zellen oder Zellbestandteilen über den SR, während TLR die Reifung von DCs durch die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen, wie CD80/CD86, induziert. Durch die Aktivierung des TLR durch z.B. Lipopolysacharide (LPS) wird die intrazelluläre Aktivierungskaskade angestoßen und Interleukine, wie IL-12, von den DCs freigesetzt. Dies fördert die Rekrutierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die an den Major-Histocompatibility-Complex II (MHCII) binden und zur klonalen Expansion anregen (Antonio Pezzutto et al., 2007). Gleichzeitig exprimieren aktivierte DCs costimulatorische Faktoren, die eine Differenzierung der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Th1-Zellen oder Th2-Zellen nach sich zieht. Th1-Zellen produzieren Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und steuern so die Beendigung einer bakteriellen oder viralen Infektion. Hingegen Th2-Zellen produzieren IL-4 und IL-13, die einen Isotypenwechsel von IgM zu IgE oder zu IgG steuern. So ist die Produktion von IgE durch B-Lymphozyten charakteristisch bei der Immunabwehr von Infektionen mit Parasiten, aber auch bei atopischen Erkrankungen (Akira et al., 2001). Die Stimulation von TLRs führt überwiegend zu einer Th1-Zell-, statt zu einer Th2-Zell-Differenzierung (Akira et al., 2006).

## **2.2 Allergie und Atopie**

Der Begriff „Allergie“ wurde 1906 durch den Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet geprägt. Unter Allergie versteht man eine überschießende Abwehrreaktion des Organismus gegenüber harmlosen Umweltstoffen, so genannten Allergenen (Clemens von Pirquet, 1906). Häufige Allergene stellen Pollen, Hausstaubmilben, Schimmelpilzsporen, Tierhaare und Lebensmittel dar. Je nach Exposition können Symptome auf den Schleimhäuten, insbesondere der oberen Atemwege, Haut und Gastrointestinaltrakt auftreten. Die Immunreaktion auf Allergene wurde 1963 von Coombs und Gell in vier Kategorien mit Unterklassen eingeteilt. Die Typ-I- bis Typ-III-Reaktionen werden durch

Antikörper vermittelt, während die Typ-IV-Reaktion durch T-Zellen ausgelöst wird (Löffler und Petrides, 2003).

Atopie beschreibt, in der Medizin, die allergische Reaktion der Typ-I-Reaktion vom Soforttyp nach dem Kontakt mit harmlosen Umweltsubstanzen. Der Begriff Atopie wird informeller Weise häufig synonym zu Allergie verwendet. Diese Arbeit fokussiert sich auf die Typ-I-Reaktion vom Soforttyp. Die Soforttypreaktion ist IgE vermittelt und setzt einen meist symptomlosen Erstkontakt zur Sensibilisierung voraus. Durch den Allergenkontakt schütten Th2-Zellen den Botenstoff IL-4 und IL-13 aus, die B-Lymphozyten zur Produktion spezifischer IgE-Antikörper gegen das Allergen aktivieren. Die IgE-Antikörper binden an den hoch-affinen IgE-Rezeptor (FcεRI) auf basophilen Granulozyten und Mastzellen und werden zu zellständigen Antikörpern. Ein erneuter Allergenkontakt führt dann über die Bindung des Allergens an die zellständigen IgE-Antikörper zu einer Degranulierung der Zellen mit massiver Freisetzung diverser Entzündungsmediatoren, wie Prostaglandine, Leukotriene und Histamin (Löffler und Petrides, 2003). Das Histamin erweitert die kleinen Blutgefäße, was zu einer Rötung und Flüssigkeitsaustritt aus den Blutgefäßen mit einer Schwellung führt. Durch die freigesetzten Chemokine werden weitere Entzündungszellen, wie Granulozyten und Makrophagen, rekrutiert und verstärken die allergische Reaktion, die lokal zu Gewebeschäden führen kann. Atopie ist ein Beispiel für eine Gen-Umwelt-Interaktion. Individuen mit einem bestimmten Genotyp reagieren mit einer überschießenden IgE-Produktion auf ein Umwelt-Allergen, wie Pollen, Hausstaubmilben, Tierhaare oder Lebensmittel. Dass eine genetische Disposition vorliegen muss, lässt sich anhand der familiären Häufung von atopischen Erkrankungen mutmaßen (Redecke et al., 2004a) (Broide, 2009). Die Entwicklung einer Atopie zeigt sich schon häufig im Säuglingsalter durch ein Ekzem, allgemein als Milchschorf bezeichnet. Es folgt der sequenzielle Verlauf über die Entwicklung von Lebensmittelallergien bis hin zu allergischen Rhinitis. Eine persistierende Provokation der Allergene auf die oberen Atemwege kann zu einem sogenannten „Etagenwechsel“ von einer allergischen Rhinitis zum *Asthma bronchiale* führen (Holgate, 1999).

### **2.2.1 Epidemiologie**

Atopische Krankheitsbilder repräsentieren ein weltweites Gesundheitsproblem. Eine Vielzahl von Studien konnte die gesteigerte Prävalenz in Industrienationen und Entwicklungs-ländern für *Asthma bronchiale*, allergische Rhinitis und atopische Dermatitis

in den letzten vier Dekaden nachweisen (Baena-Cagnani, 2001; Pawankar et al., 2011; Kamer et al., 2013).

Geschätzt leiden in Deutschland ca. 24 % der Bevölkerung unter allergischer Rhinokonjunktivitis und ca. 5 % unter allergischem *Asthma bronchiale* (Ring et al., 2009).

### **2.2.2 Klinische Ausprägung und Therapie**

Zwischen dem Allergenkontakt und dem Auftreten erster Symptome liegen bei bestehender Sensibilisierung oft nur wenige Minuten. Die Art, Menge und individuelle Prädispositionen bestimmen die Symptomatik. Diese manifestiert sich vor allem an der Haut, dem Respirationstrakt, dem Gastrointestinal Trakt, dem kardiovaskulären System und dem Zentralen Nervensystem. Abhängig von der Schwere der anaphylaktischen Reaktion werden 5 Stadien unterschieden, wobei Stadium 0 und 1 eine lokale Reaktion mit leichter Allgemeinreaktion umfasst. Hierzu zählen kutane Reaktionen, wie Urtikaria und Pruritus, und Schleimhautreaktionen, wie Rhinorrhoe und Epiphora. Im Stadium 2 kommt es bereits zu ausgeprägten Allgemeinreaktionen, wie ausgedehnte Hautmanifestationen mit Erythem und Urtikaria, begleitet durch kardiovaskuläre Dysfunktionen (Hypotonie und Tachykardie) und Dyspnoe. Stadium 3 und 4 umfassen das klinische Bild eines anaphylaktischen Schocks mit schweren kardiovaskulären Dysregulationen und Bewusstseinsintrübung bis hin zum lebensbedrohlichen Organversagen (Grevers und Röcken, 2008). Die Therapie der allergischen Reaktion richtet sich nach der Schwere der Symptomatik.

Die Allergenkarenz steht an erster Stelle der Behandlungsstrategie, Antihistaminika stehen für die symptomatische Therapie bei Rhinokonjunktivitis und topische/ systemische Kortikosteroide wie auch Leukotrienrezeptorantagonisten bei allergischem *Asthma bronchiale* zur Verfügung. Im Falle einer Allgemeinreaktion werden systemische Glykocortikoide und unter Umständen Adrenalin zur Stabilisierung der Kreislaufreaktion verabreicht. Zusätzlich können inhalative  $\beta_2$ -Sympatomimetika einen Bronchospasmus reduzieren.

Die genannten Medikamente wirken symptomatisch und sind nicht kurativ. Aus diesem Grund wurde die spezifische Immuntherapie (SIT) als krankheitsmodifizierende Behandlung etabliert. Noon beschrieb 1911 erstmalig die Möglichkeit der subkutanen Impfung mit Gräserpollen, um spezifische Symptome während der Pollensaison zu reduzieren (Noon, 1953). Die SIT ist eine kausale immunmodulierende Therapie mit dem Ziel der Reduktion der Symptomlast, Verhinderung der Krankheitsprogression (Calderon et al., 2012;

Jacobsen et al., 2007) und Reduktion der supportiven Medikation. Sie wirkt zum einen durch die Aktivierung von neuen und Boosterung von bestehenden IgG-Antikörpern, die die Bindung der IgE-Allergenkomplexe an die B-Zellen und DCs verhindern können. Ein Zweiter Wirkmechanismus besteht in der Regulation der Effektorzell-Funktion durch Aktivierung von T-regulatorischen Zellen (Tregs). Tregs haben die Fähigkeit über die Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  eine Th2-Immunantwort herunter zu regulieren (Hawrylowicz und O'Garra, 2005), eine durch Allergene ausgelöste Immunantwort zu blockieren und die Entzündungsreaktion im Gewebe zu dämpfen. Zusätzlich trägt die Freisetzung von IL-10 zur Verstärkung der oben beschriebenen Produktion von blockierenden IgG-Antikörpern bei und bremst die Rekrutierung von Th1- und Th2- Zellen. Die lokal freigesetzten Zytokine dämpfen außerdem die lokale Mastzellaktivität und die Aktivierung der anderen Effektorzellen, die zur allergischen Entzündung beitragen. Abhängig von der Allergendosis entwickelt das Immunsystem durch Konfrontation mit biologisch hohen Allergendosen und weiteren Proteinen, wie Glykoproteine und Lektine, eine Toleranz (Pfaar et al., 2014).

### **2.3 Schuppenflechte (Psoriasis vulgaris)**

Atopische Dermatitis und Psoriasis sind die zwei häufigsten auftretenden Dermatosen in den westlichen Industrieländern. Von Psoriasis sind ca. 2-3 % der europäischen Bevölkerung betroffen. Damit ist die Psoriasis eine der häufigsten chronischen Entzündungskrankheiten. In etwa 40 % der Fälle kommt die Psoriasis familiär gehäuft vor, es findet sich ein Bezug zu Merkmalen des HLA-Systems (HLA-Cw6 und -DR7). Diese Form wird als Typ I bezeichnet und der Erkrankungsbeginn liegt in der zweiten bis dritten Lebensdekade. Bei dem Typ II fehlen familiäre Häufung und HLA-Assoziation und der Gipfel der Erstmanifestation liegt in der fünften bis sechsten Lebensdekade (Mrowietz und Reich, 2009). Zudem lassen sich genetische Faktoren an 8 Genloci (PSORS 1-8) festlegen. Als wichtigster Genlocus wird PSORS 1 auf dem Chromosom 6p21 betrachtet (Allen et al., 2005). Auch in der Promotorregion des Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wurde eine Assoziation mit Psoriasis und Psoriasis-Arthritis aufgedeckt (Reich et al., 2007). Zytokinen, insbesondere IL-12 und IL-23, wird ebenfalls eine wichtige Rolle im psoriatischen Entzündungsprozess zugeschrieben (Cargill et al., 2007). Die genetischen Faktoren können dazu führen, dass bei prädisponierten Patienten leichter immunologisch vermittelte, chronische Entzündungen auftreten. Zu einem derartigen Modell passt, dass Psoriasis häufig durch auslösende Faktoren, wie Infekte der oberen Atemwege durch

Streptokokken, Medikamente ( $\beta$ -Blocker, ACE-Hemmer, Lithium, Interferon- $\alpha$ , Chloroquin) und Stress, manifest wird oder sich verschlechtert (Mrowietz und Reich, 2009). Die Pathogenese der Psoriasis ist ein Zusammenspiel der angeborenen und erworbenen Immunität, über eine Aktivierung von DCs in der Epidermis und Dermis (Schroder et al., 2006). Nachweislich spielen TLR-2 und TLR-4 hier eine einflussreiche Rolle (Begon et al., 2007). Bei der Erstmanifestation und bei Krankheitsschüben kommt es zur Aktivierung von DCs in der Epidermis und Dermis, die durch die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-23 die Entwicklung von Th1- und Th17-Zellen fördern (Sano et al., 2005). Diese T-Zellen bilden ihrerseits wieder pro-inflammatorische Mediatoren (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18) und unterdrücken die Konzentration anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10 und IL-4), die zu einer vaskulären und epidermalen Barrierestörung beitragen. Die Hautbefunde sind histologisch durch eine überschießende Proliferation und gestörte Zellreifung der Hautzellen charakterisiert. Dies führt zu einer Parakeratose als Ausdruck der verkürzten Reifungszeit (3-4 Tage statt 28 Tage). Eine Ansammlung von aktivierten Mastzellen, CD4+-T-Zellen, CD8+ zytotoxischen T-Zellen, Neutrophilen Granulozyten und eine Neoangiogenese kann in dem betroffenen Hautareal, wie bei der atopischen Dermatitis, beobachtet werden (Fritsch, 2003).

### **2.3.1 Klinische Ausprägung und Therapie**

Die typischen Hautveränderungen (Primäreffloreszenz) sind scharf begrenzte erythrosquamöse Plaques, bei der eine Rötung und Schuppung (Hyperkeratose) zu sehen ist. Die häufigste klinische Form ist mit 80 % die *Psoriasis vulgaris*. Bei ungefähr 20 % der Patienten tritt im Verlauf eine entzündliche Erkrankung der Gelenke, die Psoriasis-Arthritis, auf (Mrowietz und Reich, 2009).

Zur Klassifizierung des Schweregrades verwendet man den PASI-Index (Psoriasis Area and Severity Index), der die Symptome Erythem, Infiltration und Schuppung, sowie das Ausmaß des Befalls der vier Körperregionen erfasst. Laut Leitlinie ist PASI >10 das Kriterium für mittelschwer bis schwere Psoriasis (Mrowietz und Reich, 2009).

Eine häufige Begleiterkrankung ist die koronare Herzkrankheit mit gehäuftem Auftreten von Myokardinfarkt und Schlaganfall. Eine direkte Beteiligung, zum Beispiel durch eine endotheliale Dysfunktion durch dauerhaft erhöhte Spiegel von Mediatoren, wie vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), führt ohne das Vorliegen klassischer Risikofaktoren zu einer Atherosklerose (Ludwig et al., 2007).

Eine alleinige Lokalthherapie mit topischen Kortikoiden kann bei leichter bis mittelschwerer Psoriasis zu einem ausreichenden Therapieerfolg führen. Sehr erfolgreich und als first-line Therapie wird ein Kombinationspräparat aus dem Vitamin D3-Analogon Calcipotriol und einem mittelpotenten Kortikoid verwendet (Kragballe et al., 2006). Für mittelschwere Formen und erschwertem Ansprechen auf eine topische Therapie kommt ultraviolettes Licht zur Induktion einer Remission zum Einsatz. Die systemische Therapie kommt vor allem für Patienten mit mittelschwerer und schwerer Psoriasis und bei Patienten mit häufigen Rezidiven oder hoher Krankheitsaktivität in Betracht. In Deutschland sind Fumarsäureester und Methotrexat die am häufigsten verwendeten systemischen Medikamente. Eine Bereicherung des therapeutischen Repertoires sind die Biologika, die ein gutes Nutzen-Risiko-Profil aufweisen. Dabei handelt es sich um Zytokine, Fusionsproteine aus Oberflächenmolekülen und dem konstanten Fragment von Immunglobulinen oder Antikörpern, die das Ungleichgewicht des fehlregulierten Immunsystems ausgleichen (Mrowietz und Reich, 2009).

## **2.4 Hygienehypothese**

Die Inzidenz von Atopie in Industrienationen ist in den vergangenen vier Dekaden gestiegen. Dies scheint auf die Reduktion von bakteriellen Infektionen aufgrund einer saubereren Umgebung zurück zu führen zu sein (Bach, 2002). Diese Theorie wurde in der Hygienehypothese von Strachan 1989 erstmalig postuliert. Er beobachtete 17.414 Britische Kinder, die im März 1958 geboren wurden, über einen Zeitraum von 23 Jahren. Es wurde dargelegt, dass die Familiengröße und die Position in der Geschwisterrangfolge im Alter von 11 Jahren einen umgekehrten Zusammenhang zum Auftreten von Heuschnupfen im Alter von 11 und 23 Jahren hatten. Ebenso scheinen die verbesserten hygienischen Standards, sinkende Familiengrößen und eine damit verbundene sinkende Anzahl von Infektionen im Kindesalter potentielle Ursachen für die steigende Prävalenz atopischer Erkrankungen (Strachan, 1989) zu sein. Es wird diskutiert, dass die Exposition gegenüber mikrobiellen Agenz den stärksten Einfluss auf die postnatale Entwicklung des Immunsystems, Ausbildung von APCs und regulatorischen T-Zellen habe. Mutmaßlich aktivieren mikrobielle Liganden PRRs, wie TLRs, und spielen eine zentrale Rolle in der Prävention von Th2-vermittelten Erkrankungen, wie Atopie, oder Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen (Prescott und Bjorksten, 2007). Eine Stimulation mit PAMPs könnte die Immunantwort in Th1-Richtung lenken und so einen präventiven Einfluss gegenüber der Entwicklung von atopischen Erkrankungen haben. In mehreren Studien

konnte dargelegt werden, dass ein umgekehrter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Geschwister und dem Auftreten von atopischen Erkrankungen besteht. In einer Studie mit 812 Kindern aus ländlichem Umfeld konnte eine Korrelation zwischen Endotoxin-Exposition und verminderter Frequenz von Heuschnupfen und allergischem Asthma beobachtet werden (Braun-Fahrlander et al., 2002a).

Man darf die Hygienehypothese nicht als strenges Postulat betrachten, vielmehr besteht sie aus vier Dimensionen, die sich ergänzen. Sie umfasst die unterschiedlichen Phänotypen einer atopischen Erkrankung, den Zeitpunkt und Art des Kontakts mit den Umweltpathogenen und den genetischen Hintergrund (von Bubnoff, 2007).

### 3. Zielsetzung

Die Hygienehypothese postuliert einen Zusammenhang zwischen einem frühzeitigen Kontakt zu mikrobiellen Partikeln in der Kindheit und der Risikoreduktion, eine atopische Erkrankung, auf dem Boden einer genetischen Disposition für Atopie, zu entwickeln. Studien konnten zeigen, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen und dort gesteigerten Endotoxin-Leveln ausgesetzt sind, seltener an Heuschnupfen und allergischem Asthma leiden (Braun-Fahrländer et al., 2002b). Eine bisher noch ungeklärte Prädisposition führt zu einer anfänglich durch Th2-Zytokine dominierte Immunantwort. Der Pathomechanismus der Atopie wird hierbei oftmals in Zusammenhang zu Toll-like Rezeptoren gesehen. Hierbei interessieren besonders die TLR-2 und TLR-4, die bekannt dafür sind Bakterien LPS, Peptidoglykane und Lipoproteine zu erkennen, und über eine Signalkaskade innerhalb Dendritischer Zellen die Th2-Lymphozyten zu aktivieren.

Der Nachweis von allergen-spezifischem IgE im Blut spricht für die Entwicklung einer atopischen Erkrankung wie allergische Konjunktivitis, allergische Rhinitis oder allergisches *Asthma bronchiale*. Symptomatische Atopiker (SA) weisen erhöhte Gesamt-IgE-Level und spezifische IgE-Level gegen zum Beispiel Hausstaubmilben, aerogene Pollen, Lebensmittel oder Tierhaare, bei nachweislicher positiver Familienanamnese, auf. Trotzdem zeigen manche Individuen erhöhte allergen-spezifische IgE-Level, erhöhte Gesamt-IgE-Level oder haben eine positive Familienanamnese, ohne Symptome zu entwickeln und werden daher als asymptomatische Atopiker (AA) bezeichnet (von Bubnoff et al., 2004a). Eine Sensibilisierung durch Antigene scheint also nicht immer zu einer klinischen Manifestation einer atopischen Erkrankung zu führen. Hier können Antigen-präsentierende Zellen, wie Monozyten und DCs, genetische oder/und umweltgeprägte Variationen der Oberflächenproteine zeigen, die eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von atopischen Erkrankungen spielen. Zum Beispiel ist die Oberflächenexpression des hochaffinen Rezeptors für IgE (FcεRI) auf APCs positiv mit dem Vorliegen einer Atopie assoziiert (von Bubnoff et al., 2004b), führt aber nicht unweigerlich zu der Ausprägung von Symptomen. Polymorphismen des FcεRI, Interaktionen zwischen TLRs und FcεRI, eine Th1/Th2-Dysbalance, Unterschiede in der T-Zell-Regulation und der Einfluss von mikrobiellen Antigenen scheinen zu einer Differenzierung in symptomatische Atopiker (SA) und asymptomatische Atopiker (AA) zu führen (Ozdemir et al., 2010). Als Nicht-Atopiker (NA) werden die Probanden benannt, die weder klinische Symptome einer atopischen Erkrankung noch erhöhte Serum IgE-Level aufweisen.

Eine positive Familienanamnese darf vorliegen, wird aber entschieden seltener beobachtet als bei Atopikern.

Die Toll-like Rezeptoren gehören zu der Familie der PRRs. Diese PRRs beeinflussen über die intrazelluläre Signalkaskade die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, Phagozytose, Bahnung von intrazellulären Antigenwegen und die Reifung von DCs, die nachfolgend einen Einfluss auf die Entwicklung des adaptiven Immunsystems nehmen (van Vliet et al., 2007). Auch wenn viele Regulationsmechanismen der TLR-vermittelten Immunantwort beschrieben wurden, scheint die Hochregulation von TLR-2 und TLR-4 als Antwort auf LPS und Anpassung des TLR-9 auf spezifische Liganden, der vielversprechendste Regulationsmechanismus in der Entwicklung von Atopie zu sein (Majak et al., 2009).

Der Pathomechanismus der Psoriasis vulgaris steht in engem Zusammenhang einer überschießenden Aktivität und Migration der Th1-Zellen in die Epidermis. Da die Psoriasis ein klassischer Vertreter der Aktivierung von Th1-Zellen im Rahmen der Immunantwort ist, wurden Psoriasis Patienten als eine von 2 Kontrollgruppen gegenüber den Atopikern ausgewählt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es:

- Unterschiede im Expressionsmuster der TLR-2, -4, und -9 auf mRNA-Ebene in Zellen des peripheren Blutes bei symptomatischen Atopikern (SA), asymptomatischen Atopikern (AA), Nicht-Atopikern (NA) und Psoriatikern (P) nachzuweisen
- Die Expressionskinetik der TLR-2, -4, und -9 bei der Entwicklung von Monozyten zu Dendritischen Zellen darzustellen
- ein Verständnis der TLR-Expression/-Expressionskinetik im direkten Vergleich zwischen SA und AA zu erlangen und neue Wege der Therapie zu ermöglichen.

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

Monovetten	(9 ml Volumen) mit EDTA oder Serum-Gel; Sarstedt, Nümbrecht
Butterflys	Safety-Multifly®, Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugen	Allegra 6R-und GP-Centrifuge; Beckmann Coulter, Krefeld Allegra X-15R; Beckmann Coulter, Krefeld Allegra X-22; Beckmann Coulter, Krefeld Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg
Centrivac	Heraeus (Kendro), Hanau
Immulite 2000	DPC Biermann, Bad Nauheim
Sterilbank	HeraSafe; Heraeus (Kendro), Hanau
Abzug	Hohenloher, Öhringen
Pipetten	P20, P100, P200, P1000; Gilson, Middleton; Wisconsin, USA 5 ml, 10 ml, 25 ml Serological Pipet; Falcon (BD), Heidelberg
Tubes	15 ml, 50 ml Falcon Tubes; Falcon (BD), Heidelberg 500 µl, 1 ml Eppendorf Tubes; Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	pipetus-Akku; Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt pipetus-Standart; Hirschmann-Labor- geräte, Eberstadt
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht; Balgach, Schweiz
Invertierendes Mikroskop	IMT-2; Olympus, Hamburg
Sterile Einweg 12-er Kulturplatte	Falcon (BD), Heidelberg

Durchflusszytometer	FACS Calibur; BD, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Inkubator	HeraCell; Heraeus, Hanau
Eagle Eye <sup>TM</sup> II	Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA
Heizblöcke	Thermomixer 5436; Eppendorf, Hamburg
Photometer	Biochrom; Cambridge, England
Präzisionsküvette	Hellma, Müllheim
Reinstwasseranlage	Milipore; Schwalbach
Kühlgeräte	ÖKO_Santo-Super; AEG, Stockholm, Schweden Liebherr; Ochsenhausen Herafreeze, Heraeus (Kendro), Hanau
Bottle-Top-Filter	NALGENE <sup>®</sup> ; Nalge Nuc, Rochester, New York, USA
Waagen	diverse
Rotor Gene RG-3000	Corbett Research

#### 4.1.2 Chemikalien

Dextran 500	Sigma, Taufkirchen
Nycoprep	AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norwegen
Etylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogen-Phosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogen-phosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogen-phosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Sigma, Taufkirchen
Trizol	TRIZOL-Reagenz; Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)amino-methan, (Trisma-Base)	Sigma, Taufkirchen
DNA-Free™-Kit	Ambion, Hamburg
Glycogen	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
SuperScript™II-RT-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
HotstarTaq Master Mix-Kit	Qiagen, Hilden

#### 4.1.3 Medien

Roswell Park Memorial Institut (RPMI) - 1640	Biochrom AG, Berlin
Antibiotikum/Antimykotikum	Gibco (Invitrogen), Eggenstein
Fötales Kälberserum(FKS) hitzeinaktiviert	Sigma, Taufkirchen

Mausserum

Dianova, Hamburg

#### 4.1.4 Cytokine

rekombinantes IL-4

Stratmann Biotech, Hannover

rekombinantes GM-CSF

Leicomax; Novartis, Basel, Schweiz

#### 4.1.5 Antikörper

Antikörper	Isotyp	Konjugation	Verdünnung	Klon	Herkunft
7-Aminoactinomycin	(7AAD-PE)				Sigma, Taufkirchen
Maus-IgG2b		nein	1:200	G155-178	BD, Heidelberg
Maus-anti-CD 14	IgG1	PE	1:200	MP9	BD, Heidelberg
Maus-anti-CD 1a	IgG1	PE	1:200	T6RD1	Beckmann Coulter, München

#### 4.1.6 Lösungen

PBS 10-fach (pH 7,4):

1,35 M NaCl  
27 mM KCl  
80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O  
15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Monozyten-Waschpuffer

155 mM NaCl  
4,5 mM EDTA  
0,1 % (w/v) BSA

FACS-Puffer 10-fach

1,45 M NaCl  
75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
32,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
155 mM NaN<sub>3</sub>  
10 % (w/v) FKS

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Probanden

Für diese Arbeit wurde nach Genehmigung der Ethikkommission der Universität Bonn und Aufklärung und Einwilligung der Probanden mit peripherem Blut von Probanden mit symptomatischer Atopie, asymptomatischer Atopie, *Psoriasis vulgaris* und einer gesunden Kontrollgruppe gearbeitet. Aus dem Blut wurden, wie unter 4.2.3 beschrieben, Monozyten isoliert.

Die Probanden nahmen zum Zeitpunkt der Blutabnahme seit mindestens vier Wochen keine systemischen Medikamente, die Einfluss auf das Immunsystem haben könnten (z.B. Kortison, Immunsuppressiva, Antihistaminika). Die Psoriasis-Probanden befanden sich in einem akuten Schub der Erkrankung, während die Atopiker weitestgehend keine Symptome zeigten.

Die Zuordnung der Gruppen erfolgte anhand einer gründlichen, auf einem selbst erstellten Fragebogen basierenden, Anamnese und dem im RAST-Verfahren ermittelten spezifischem und Gesamt-Serum-IgE-Spiegel.

Um das Gesamt-IgE der Probanden zu bestimmen, wird eine Monovette mit Serum-Gel abgenommen und über die Klinik und Poliklinik für Dermatologie durch den Immulite 2000 auf den Gesamtgehalt von IgE und spezifischem IgE untersucht. Die Ergebnisse der Analyse werden in CAP-Klassen und absoluten Werten erfasst.

Einschlusskriterien für die Gruppe der symptomatischen Atopiker ist (1.) das anamnestische Vorliegen von typischen Symptomen einer allergischen Rhinitis oder Konjunktivitis; (2.) der Nachweis von spezifischem IgE ( $> 0,7$  kU/l, CAP-Klasse 2) gegen ein oder mehrere häufig vorkommende inhalative Allergene mit oder ohne Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegels ( $>100$  kU/l). Asymptomatische Atopiker werden eingeschlossen, wenn sie (1.) keine typischen Symptome einer allergischen Erkrankung in den vergangenen 5 Jahren vor der Untersuchung zeigten und (2.) eine Erhöhung von spezifischem IgE ( $> 0,7$  kU/l, CAP-Klasse 2) gegen ein oder mehrere häufig vorkommende inhalative Allergene mit oder ohne Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegels ( $>100$  kU/l) aufweisen. Nicht-Atopiker weisen (1.) in der Anamnese keine Symptome einer allergischen Erkrankung auf und zeigen (2.) keine spezifische IgE-Erhöhung ( $< 0,7$  kU/l,  $\leq$  CAP-Klasse 1) gegen häufig vorkommende inhalative Allergene oder Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegels ( $< 100$  kU/l). Psoriasis Patienten haben (1.) eine klinisch oder histologisch gesicherte Psoriasis ohne Arthritis und weisen (2.) in der Anamnese keine Symptome einer allergischen Erkrankung

auf. Zudem zeigen sie (3.) keine spezifische IgE-Erhöhung ( $< 0,7$  kU/l,  $\leq$  CAP-Klasse 1) gegen häufig vorkommende inhalative Allergene oder Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegels ( $< 100$  kU/l).

**Tab. 2:** Probandenauswertung aufgeschlüsselt für die Gruppen der symptomatischen Atopiker (SA), asymptomatischen Atopiker (AA), Nicht-Atopiker (NA) und Psoriasis Patienten (P). [m= männlich, w= weiblich, MW= Mittelwert, SD= Standardabweichung]

Probandengruppe	SA (n= 12)	AA (n=11)	NA (n=14)	P (n= 13)
<b>Geschlecht</b>	m=8/ w=4	m=3/ w=8	m=4/ w=10	m=7/ w=6
<b>Alter (in Jahren)</b>	30±12	23 ± 3	22 ±1	44 ± 19
<b>Gesamt-IgE (in kU/l)</b>	173,74 ±	121,32 ±	18,55 ±	48,10 ±
<b>MW und SD</b>	180,23	131,52	28,75	60,77
<b>Atopie in der Kindheit</b>	83,3 %	27,3 %	0 %	7,7 %
<b>Positive Familien-Anamnese für Atopie</b>	91,6 %	63,6 %	35,7 %	38,5 %
<b>Einzel- oder Doppel-Sensibilisierung</b>	16,4 %	81,8 %	0 %	0 %
<b>Mehrfach-Sensibilisierung</b>	83,3 %	18,2 %	0 %	0 %

#### 4.2.2 Radio-Allergo-Sorbens-Test (RAST)

RAST ist ein Labortestverfahren, das bei Verdacht auf eine Allergie vom Soforttyp durchgeführt wird, um allergenspezifische Antikörper der Immunglobulinklasse E (IgE) im Blutserum des Patienten zu quantifizieren. Es wird der spezifische IgE-Gehalt gegen folgende Allergene bestimmt: *Dermatophyt pteronyssinus*, *Dermatophyt farinae*, Katzenhaare, Roggen, Lieschgras, Erle, Birke, Hasel, Beifuß. Das Allergen-Konjugat wird mit dem Blutserum des Patienten versetzt und das IgE, das für das Allergen spezifisch ist, bindet sich an das Allergen-Konjugat. Anschließend wird ein radioaktiv markierter Antikörper hinzugegeben, der das gebundene IgE erkennt und an dieses bindet. Durch Messung der Radioaktivität lässt sich dann die Menge an IgE bestimmen, die an das Allergen-Konjugat gebunden hat.

#### 4.2.3 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) erfolgt aus 90 ml EDTA-stabilisiertem Vollblut der Probanden mittels

modifiziertem Protokoll der Dichtegradientenzentrifugation (Novak et al., 2001). Da Monozyten gegenüber Lymphozyten eine höhere osmotische Resistenz aufweisen, können Sie durch die Zugabe von Dextran getrennt werden. Hierzu wird dem Blut im Verhältnis 1/10 8 %-iges Dextran 500 (gelöst in einer 155 mM NaCl-Lösung) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen und Abwarten einer Inkubationszeit von ca. 45-60 min bei Raumtemperatur, bildet sich ein Sediment aus Erythrozyten und Lymphozyten. Das Plasma kann nun abgenommen werden und im Volumenverhältnis 2:1 über Nykoprep (Dichte 1,0068 g/cm<sup>2</sup>) der Firma AXIS SHIELD PoC AS geschichtet werden. Um den Gradienten zu erzeugen, wird die Blut-Nykoprep-Schichtung für 20 min bei 670xG zentrifugiert. Es bildet sich eine weiße monozytenhaltige Interphase, die abgenommen und drei Mal mit einem Wasch-Puffer gewaschen wird (Zentrifugation: 10 min, 140xG). Anschließend wird das Sediment in Medium für Monozyten (RPMI-1640, *very low endotoxine*) aufgenommen. Dem Medium wurde vor dem Gebrauch 10 % Fötale Kälberserum (FKS) und 1 % Antibiotikum/ Antimykotikum zugefügt.

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mittels Neubauer Zählkammer. Es werden  $2 \times 10^6$  Monozyten als Dry Pellet zur späteren RNA-Isolation in 1 ml TRIzol Reagent® bei -80 Grad C eingefroren.

#### **4.2.4 Durchflusszytometrische Messung von Oberflächenantigenen auf Monozyten**

Die Durchflusszytometrie (Flourescence Activated Cell Sorting, FACS) ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen durch Messung der Floureszenzintensität. Hierzu kommen floureszenzgekoppelte spezifische Antikörper gegen Zelloberflächenantigene zum Einsatz, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und daraufhin Licht einer höheren Wellenlänge emittieren. Die Zellen, der zu untersuchenden Zellsuspension, werden in einer Trägerflüssigkeit mit Überdruck vereinzelt an einem Laserstrahl (Argonlaser 488 nm) vorbeigeleitet, der die Elektronen des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffs anregt, die absorbierte Energie in Form von Licht einer höheren Wellenlänge abzugeben. Das auftreffende Licht wird durch die Einzelzellen gestreut. Der größte Teil des Lichtes wird in geringem Winkel vorwärts gestreut (forward light scatter, FSC) und korreliert mit der Größe der Zellen, während das im 90°-Winkel gestreute Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter) mit der Granularität der Zellen korreliert (Vgl. Prinzip der FACS-Analyse und Streuungsverhalten verschiedener Immunzellen (Antonio Pezzutto et al., 2007) )

Zur Analyse der Oberflächenexpression von CD 14 auf Monozyten werden pro Färbearbeit 30.000 Zellen verwendet. Diese werden für 20 min mit dem Phycoerythrin (PE) markierten Antikörper gegen humanes CD 14 und der IgG2b-Isotypenkontrolle bei 4 Grad C für 2 min inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit werden die Zellen einmal mit PBS (250xG/10 min) gewaschen, um ungebundene Antikörper auszuwaschen. Die Messung erfolgt in einem FACS-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (BD Biosciences, Heidelberg) und die Daten werden mit dem Programm Cell Quest (BD Biosciences, Heidelberg) ausgewertet.

Die Reinheit der, zur Kultivierung der Dendritischen Zellen, verwendeten Monozyten liegt bei >90 %.

#### 4.2.5 Kultivierung von Dendritischen Zellen

Die isolierten Monozyten werden in RPMI-Medium aufgenommen, sodass  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter vorliegen. Jeweils 1 ml Zellsuspension wird je Loch in einer sterilen 12-Loch Falcon Kulturplatte bei 37 Grad C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Generierung von DCs werden IL-4, GM-CSF und RPMI-Kulturmedium nach folgender Tabelle verwendet:

**Tab. 3: Kultivierung von DCs aus Monozyten** unter Zugabe von Interleukin 4 (IL), Wachstumsfaktor GM-CSF und Kulturmedium an den Tagen 0, 2 und 4

Tag 0	Tag 2	Tag 4
+ 2 µl IL-4	+ 1 µl IL-4	+ 2 µl IL-4
+ 3,6 µl GM-CSF	+ 1,8 µl GM-CSF + 50 µl RPMI Medium	+ 3,6 µl GM-CSF + 500 µl RPMI Medium im Austausch

Am 6.Tag der Kultivierung werden die Zellen, nach optischer Kontrolle unter dem Inversionsmikroskop, in Suspension gebracht und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Nach durchflusszytometrischer Reinheitskontrolle unter Analyse der Oberflächenexpression von CD 1a gegenüber der IgG2b-Isotypenkontrolle, werden die gereiften DCs als Dry Pellet zur späteren RNA-Isolation in 1 ml TRIzol Reagent® bei -80 Grad C eingefroren.

#### 4.2.6 RNA Extraktion aus Monozyten und gereiften DCs

Die RNA-Isolation ermöglicht eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit, da nur die Gene, die zum Zeitpunkt der Isolation in der Zelle transkribiert werden, als RNA vorliegen. Alle

Methoden der RNA-Isolation beruhen darauf, die Zellen in einer chemischen Umgebung zu lysieren, RNasen zu denaturieren und zelluläre Bestandteile abzutrennen.

Wir machen uns die sogenannte single-step Methode nach Chomczynski und Sacchi unter Anwendung von TRIzol Reagent® der Firma Invitrogen zu nutzen (Chomczynski und Sacchin, 1987). Die Schritte der RNA-Extraktion erfolgen auf Eis unter einem Abzug. Trizol enthält Guanidinthiocyanat, das die Zellen lysiert und gleichzeitig RNasen und andere Enzyme deaktiviert. Zusätzlich enthält das Reagenz Phenol, in dem sich die vorhandene RNA löst. Durch Zugabe von 200 µl Chloroform und Zentrifugation (13.000xG, 15 min, 4 Grad C) erfolgte die Phasentrennung. Es bildeten sich 3 Phasen, wobei die obere wässrige Phase (ca. 400 µl) RNA enthält, die abpipettiert und mit der gleichen Menge Isopropanol präzipitiert wird. Die Interphase enthält DNA und die untere Chloroformphase Proteine. Der präzipitierten RNA wird zum Schutz bei den weiteren Waschschritten 0,5 µl Glycogen für eine Ruhezeit von 2 Stunden bei -80 Grad C zugefügt. Nach Zentrifugation (15.600xG, 15 min, 4 Grad C) liegt die RNA als Pellet vor, das mit 75 prozentigem Ethanol gewaschen (15.600xG, 15 min, 4 Grad C) und in 50 µl Ampu-Wasser aufgenommen wird. Um sicher Reste genomischer DNA aus den RNA-Proben zu entfernen, wird vor der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau mit Hilfe des DNA-Free™-Kit (Firma Ambion, Hamburg), durchgeführt. 50 µl RNA-Probe werden mit 5 µl 10xDNase Buffer und 1 µl rDNase vermischt und bei 37 Grad C für 20 min inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 5 µl DNase Inactivation Reagenz wird die DNase inaktiviert und nach Zentrifugation (10.000xG für 1,5 min) als Pellet gebunden. Der RNA-haltige Überstand kann nun zur Reversen Transkription verwendet werden. Um gleiche Mengen von RNA zur Reversen Transkription zu verwenden, kann mittels Photometerkontrolle die RNA-Menge/ml errechnet werden. Für die Reverse Transkription wird jeweils 1 µg RNA je Probe verwendet.

#### **4.2.7 Reverse Transkription**

Die extrahierte Gesamt-RNA besteht aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und nur zu 1-3 % messenger RNA (mRNA), die in dieser Arbeit über das Expressionsmuster von TLRs auf mRNA-Ebene interessiert. Hierzu muss diese in komplementäre DNA (cDNA) für die Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (real-time-PCR) umgeschrieben werden.

Um RNA-Sekundärstrukturen aufzuschmelzen wird 1 µg RNA (in 15 µl H<sub>2</sub>O) für 3 min bei 65 Grad C inkubiert. Auf Eis wird der Reverse Transkription-Reaktion-Mix bestehend aus,

0,5 µl RNase-Inhibitor, 2 µl Random Primer, 16 µl dNTP (1,25 mM), 10 µl 5xReaktionspuffer und 5 µl DTT (0,1 M) zugegeben. Nach 2 min bei 37 Grad C wird 1 µl *SuperScript™-Reverse-Transkriptase* in den Ansatz pipettiert und dieser weitere 60 min bei 37 Grad C inkubiert. In einem abschließenden 3-minütigen Inkubationsschritt bei 95 Grad C wird die Reverse Transkriptase deaktiviert und 50 µl H<sub>2</sub>O zugefügt. Alle verwendeten Komponenten sind im *SuperScript™II-RT-Kit* enthalten.

Zur Kontrolle, dass die Proben cDNA enthalten, wird eine *PCR* durchgeführt. Mit der *PCR* können kleinste DNA-Mengen in-vitro vervielfältigt werden. Zu der Probe werden zwei Oligonukleotide mit definierter Sequenz (Primerpaar), Nukleotide, Puffer und eine thermostabile Polymerase gegeben. Es erfolgen nun mehrfach wiederholte Zyklen aus drei Einzelschritten: Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung. Hierfür wird 5 µl cDNA-Probe mit 5 µl 10xPCR-Buffer, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 8 µl dNTP (1,25 mM), jeweils 0,5 µl Sense- und Antisens-Primer und 0,25 µl *Taq-Polymerase* angesetzt und 26 Cyclen im *PCR-Cycler* durchlaufen lassen. Für 50 min wird an 15 µl der Probe + 2 µl Bromphenolblau, sowie einem Leiter und einer negativ Kontrolle 100 V Spannung in einem 2 prozentigen Aggarosegel angelegt. Die visuelle Auswertung erfolgt mit der *Eagle Eye™II-Kamera*.

#### **4.2.8 Real-Time Amplifikation mittels TaqMan™-PCR-Technologie**

Die Real-Time *PCR* stellt ein schnelles Verfahren zur in-vitro Vervielfältigung und Quantifizierung der zu untersuchenden Genexpression auf mRNA-Ebene dar. In einem Schritt findet kombiniert die Amplifikation, *PCR*-Produkt-Detektion und –Quantifizierung statt. Die Methode erlaubt die direkte Detektion der *PCR*-Produkt-Akkumulation über eine Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonde, wobei die Intensität des Signals mit der Menge des *PCR*-Produkts in Echtzeit (Real-time) korreliert.

Bei der *TaqMan™-PCR-Technologie* wird zusätzlich zu den beiden Primern einer klassischen *PCR*, eine sequenz-spezifische Oligonukleotid-Sonde, die mit zwei Farbstoffen markiert ist, verwendet. Die Sonde wird so gewählt, dass sie zwischen den beiden Primern hybridisiert und am 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe blockiert ist, um zu verhindern, dass sie durch die Polymerase verlängert wird. Das 5'-Ende der *TaqMan*-Sonde ist mit einem Reporterfarbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) und das 3'-Ende mit einem sogenannten Quencher (BHQ-1) gekoppelt (Livak et al., 1995). An die gesuchte DNA-Sequenz binden sowohl die spezifischen Primer (siehe Tabelle 4) als auch die Sonde, und die Polymerase beginnt die Primer zu verlängern. Hierbei stößt sie auf die

ebenfalls gebundene fluoreszenzmarkierte Sonde. Da die Taq-Polymerase neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität auch über eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität verfügt, wird die Sonde hydrolysiert und die Reporter-Fluoreszenz steigt, dies kann durch die optische Detektionseinheit des PCR-Gerätes gemessen werden. Das Fluoreszenzprodukt steigt während der PRC proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes an (Hugget et al. 2005 und Nolan et al. 2006).

Für den Reaktionsansatz werden 2 µl der cDNA-Proben verwendet und die PCR-Reaktionsabfolge besteht aus 15 min bei 95 Grad C, gefolgt von 45 Zyklen von 15 sec bei 94 Grad C, 20 sec bei 58 Grad C und 20 sec bei 72 Grad C.

**Tab. 4: Forward und reverse Primer der Real-time PCR**

	Forward Primer	Reverse Primer
<b>β-actin</b>	5' GAT GAG ATT GGC ATG GCT TTA 3'	5' AAC CGA CTG CTG TCA CCT TC 3'
<b>TLR2</b>	5' GGG TTG AAG CAC TGG ACA AT 3'	5' CTG CCC TTG CAG ATA CCA TT 3'
<b>TLR4</b>	5' CGT GAG ACC AGA AAG CTG G 3'	5' AGG TGG CTT AGG CTC TGA TAT G 3'
<b>TLR4 Taqman probe: 5' (FAM) CCT GCG TGG AGG TGG TTC CTA A (BHQ-1) 3'</b>		
<b>TLR9</b>	5' AAA TGG CCT TTG ACT CAT GG 3'	5' ACA GCA GCT ACA GGG AAG GA 3'

#### 4.2.9 Statistische Auswertung

Die Bestimmung der Fallzahl erfolgte vor Beginn der Versuche in Absprache mit dem Institut für Medizinische Biometrie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Tests wurden in Rücksprache auf ihre Eignung und Anwendung mit dem Institut für medizinische Biometrie verwendet.

Zur Auswertung wird das Programm Excel 2000 von Microsoft und das Statistikprogramm SPSS 12.0 (Version 2.12.1, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2010) verwendet.

Die Auswertung des Fragebogens erfolgte mittels SPSS. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichung für die stetigen Werten, wie Alter, Gesamt-IgE, spezifisches IgE und mRNA-Kopienzahlen der TLRs gebildet und die kategorialen Werte wurden als relative Häufigkeiten erfasst.

Zur graphischen Verdeutlichung von Häufigkeiten wurden Balkendiagramme ausgewählt und der Vergleich der mRNA Expression der TLRs wurde in Box Plotts verdeutlicht.

Die Auswertung des Gesamt-IgE wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse über alle Gruppen mit anschließendem post-hoc T-Test durchgeführt. Die p-Werte des post-hoc-Test sind nach Dunnett korrigiert und der Typ SA als Referenz angenommen.

Die Auswertung des spezifischen IgE wurde mittels T-Test für unabhängige Stichproben ermittelt, da hier lediglich der Vergleich der Probandengruppen AA und SA von Interesse war. Die Kontrollgruppen NA und P durften definitionsgemäß keine relevanten spezifische IgE Werte aufweisen.

Der Vergleich der mRNA Expression von TLR auf Monozyten und Dendritischen Zellen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit post-hoc T-Test über alle Gruppen. Hier wurde die Signifikanz mittels zweiseitigen T-Tests für unabhängige Stichproben erhoben. Die Kinetik der mRNA Expression von TLRs auf Monozyten zu Dendritischen Zellen innerhalb der Probandengruppen wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung und post-hoc T-Test für gepaarte Stichproben mit korrigierten p-Werten nach Bonferroni erfasst.

Eine Korrelation zwischen Gesamt-IgE und mRNA Expression wurde mittels Spearman-Rank-Test erfasst.

### **4.3 Patienten und Kontrollgruppen**

Das in die Untersuchung aufgenommene Probandenkollektiv umfasste 50 Probanden im Alter von 19-68 Jahren. Der Altersdurchschnitt lag in der Gruppe der Psoriasis Patienten mit 44 Jahren am höchsten, in der Gruppe der SA lag er bei 30 Jahren, bei den AA bei 23 Jahren und bei den NA bei 22 Jahren. Das mittlere Alter der Psoriasis Patienten war gegenüber den anderen 3 Probandengruppen signifikant höher. Zwischen den zu untersuchenden Gruppen der AA und SA zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Alters ( $p=0,093$ ). Es waren 28 Probanden weiblich und 22 Probanden männlich. Atopisch geprägte Probanden konnten anhand des erhöhten Gesamt-IgE-Spiegels im Serum, der spezifischen IgE Erhöhung für gängige aerogene Allergene und der positiven Familienanamnese klar von den Nicht-Atopikern und Psoriasis Patienten getrennt werden. Für die Einteilung in asymptomatische Atopiker und symptomatische Atopiker war das Auftreten von Symptomen in den vergangenen 5 Jahren wichtig. Es beschrieben 27,3 % der AA eine klinische Ausprägung der Atopie in der Kindheit, die im Erwachsenenalter nicht mehr bestand. Auch 7,7 % der Psoriasis Patienten erinnerten sich an atopie-spezifische Symptome in der Kindheit. Während für SA eine mehrfache

Sensibilisierung gegen Allergene charakteristisch war (83,3 %), wiesen 81,8 % der AA lediglich eine Sensibilisierung gegen ein oder zwei Allergene auf.

**Tab. 5: Probandenauswertung** aufgeschlüsselt für die Gruppen der symptomatischen Atopiker (SA), asymptomatischen Atopiker (AA), Nicht-Atopiker (NA) und Psoriasis Patienten (P). [m= männlich, w= weiblich, MW= Mittelwert, SD= Standardabweichung]

Probandengruppe	SA (n= 12)	AA (n=11)	NA (n=14)	P (n= 13)
Geschlecht	m=8/ w=4	m=3/ w=8	m=4/ w=10	m=7/ w=6
Alter (Jahre)	30 ± 12	23 ± 3	22 ± 1	44 ± 19
Total IgE (kU/l) MD und SD	173,74 ± 180,23	121,32 ± 131,52	18,55 ± 28,75	48,10 ± 60,77
Atopie in der Kindheit	83,3 %	27,3 %	0 %	7,7 %
Positive Familien- Anamnese für atopische Einzel- oder Doppel- Sensibilisierung	91,6 % 16,4 %	63,6 % 81,8 %	35,7 % 0 %	38,50 % 0 %
Mehrfach- Sensibilisierung	83,3 %	18,2 %	0 %	0 %

#### 4.3.1 Auswertung des Fragebogens

Die Probanden haben vor der Blutentnahme eine Probandeninformation und Einverständniserklärung über die Untersuchung erhalten. Es wurde ein selbsterstellter Fragebogen (siehe Anhang) zur Erfassung der Beschwerden, der Eigen- und Familienanamnese ausgefüllt.

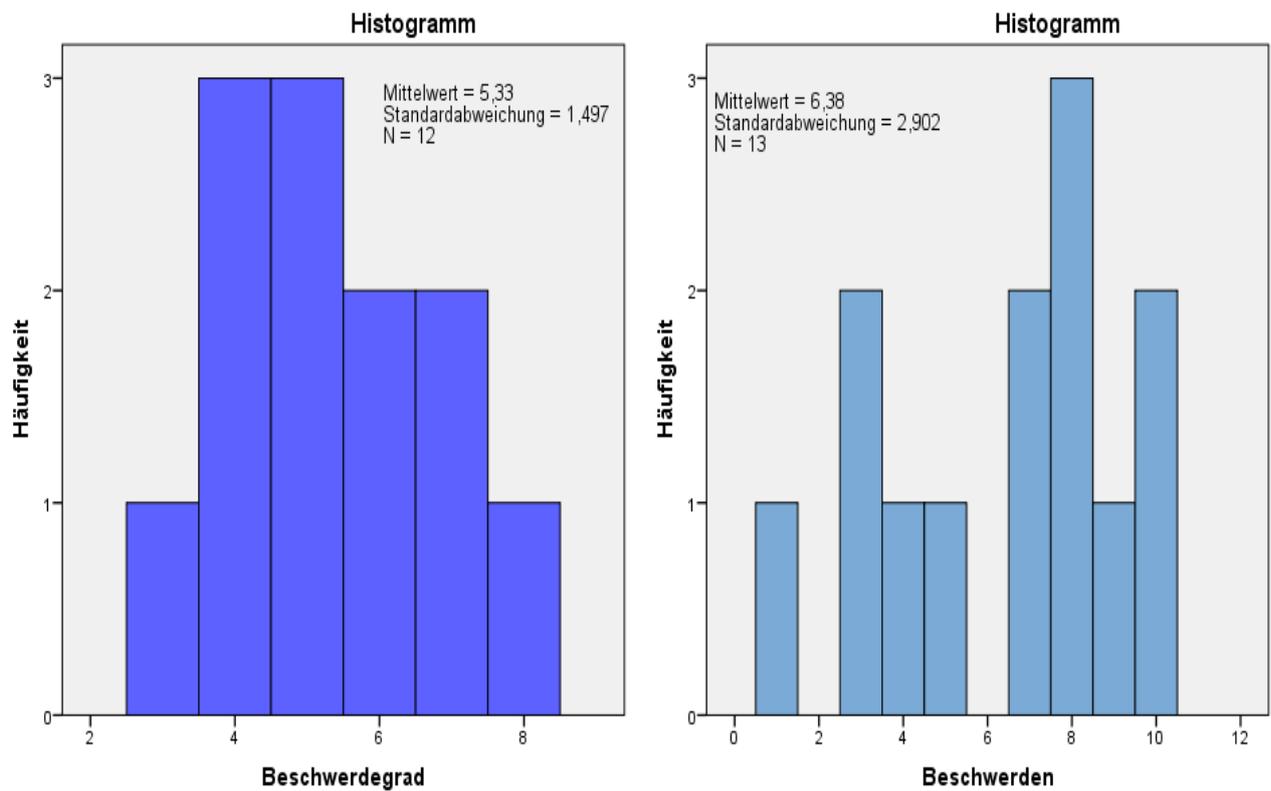
In dem Fragebogen wurden Daten zum Manifestationsalter, der Beschwerdestärke, dem Auftreten von Beschwerden in örtlich und saisonalem Zusammenhang, Beschwerden in der Kindheit, Therapieformen, Lokalisation und Provokationsfaktoren von Hautläsionen im Rahmen einer Psoriasis und die Familienanamnese abgefragt. Die Probanden der Gruppe der NA und AA waren für bestimmte Fragestellungen bei der Auswertung des Fragebogens zu vernachlässigen, da die Gruppen durch fehlende Beschwerdesymptomatik charakterisiert wurde.

Das mittlere Manifestationsalter lag für die Gruppe der SA bei 13 Jahren und für die Psoriasis Patienten bei 29,4 Jahren, hier lag die Spannbreite der Werte allerdings zwischen dem 2. und dem 60. Lebensjahr. In der nächsten Frage sollten die Probanden ihre subjektive Beschwerdestärke auf einer Skala von 1 bis 10, wobei 1 sehr schwach und

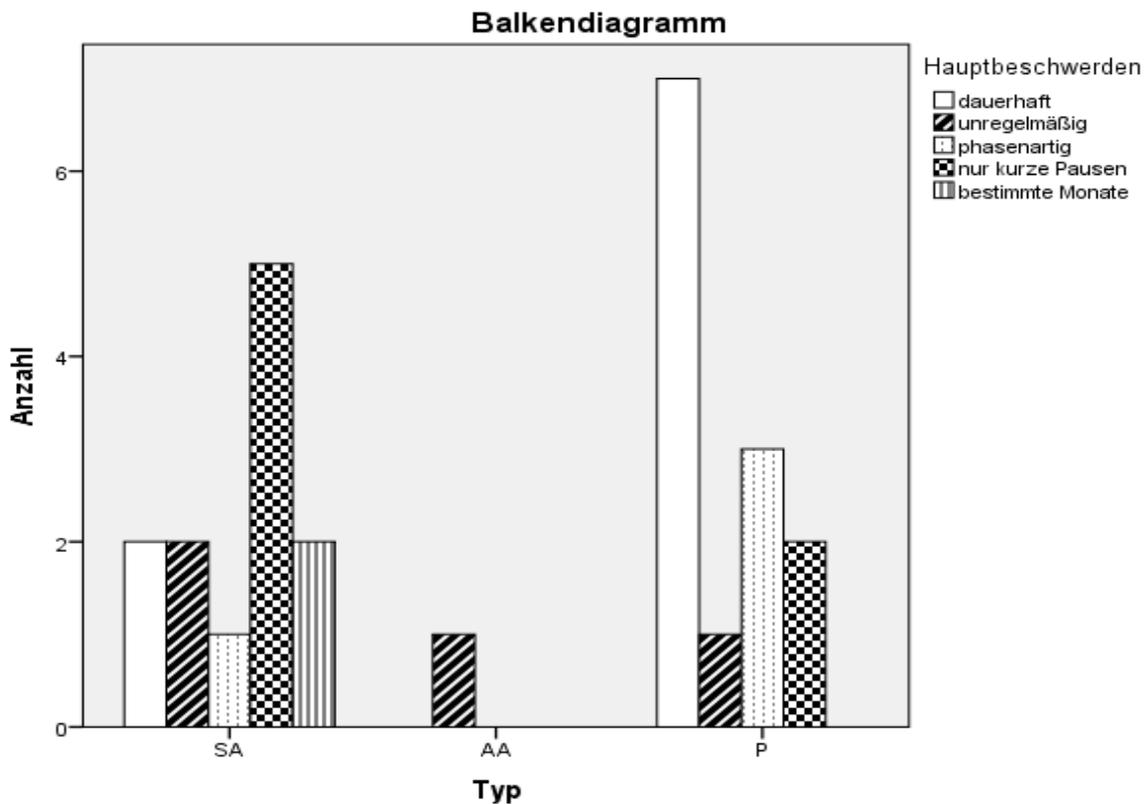
10 sehr stark ist, bewerten. Unter Beschwerden wurden körperliche Symptom, wie Juckreiz, Niesreiz, Rhinorrhoe und Augenbrennen subsummiert. Insgesamt fiel auf, dass die Psoriasis Patienten Beschwerden, wie Juckreiz, deutlich stärker empfanden als die symptomatischen Atopiker. Der Mittelwert der subjektiven Beschwerdenstärke lag bei 5,3 bei den SA und bei 6,4 bei den P. Die einzelnen Häufigkeiten sind in dem folgenden Diagramm (Abb. 8) dargestellt.

So empfanden 23,1 % der Psoriasis Patienten ihre Beschwerden bei Stufe 8, während dies nur 8,3 % der SA ebenso einschätzten. 23,1 % der befragten Psoriasis Patienten stufen ihre Beschwerden sogar stärker als Stufe 8 ein. Eine mögliche Erklärung, dieser subjektiven Wahrnehmung, wäre das dauerhafte Auftreten von Beschwerden, während die Atopiker meist saisonal Beschwerden empfanden.

Während nur 16,7 % der SA dauerhafte Symptome angaben, waren dies in der Gruppe der P 53,8 %. Die meisten, ca. 58,4 % der symptomatischen Atopiker, bemerkten nur in bestimmten Monaten oder mit saisonalen Pausen Anzeichen einer allergischen Rhino-Konjunktivitis. Ebenso sahen 84,6 % der Psoriasis Patienten keine Abhängigkeit der Beschwerden vom Aufenthaltsort, während dieses nur 33,3 % der SA angaben. Hier traten die Aufenthaltsorte im Freien mit 58,3 % und in Kontakt mit Tieren mit 66,7 % in den Vordergrund (Mehrfachantwort möglich).



**Abb. 4: Häufigkeitsverteilung des subjektiven Beschwerdegrades** für Symptome, wie Juckreiz, Niesreiz, Rhinorrhoe und Augenbrennen auf einer Skala von 1-10 von Symptomatischen Atopikern (links) und Juckreiz, Rötung, Schuppung für Psoriasis Patienten (rechts). Der mittlere Beschwerdegrad wurde von den Symptomatischen Atopikern auf einer subjektiven Messskala bei 5 angegeben, während die Psoriasis Patienten im Mittel einen Beschwerdegrad von 6 angaben. Zwei Psoriasis Patienten schätzen ihren Beschwerdegrad bei 10, während die Symptomatischen Atopiker maximal einen Wert von 8 angaben.



**Abb. 5: Häufigkeitsverteilung des Auftretens der Hauptbeschwerden**

Die Probanden der Gruppen symptomatische Atopiker (SA), asymptomatische Atopiker (AA) und Psoriasis Patienten (P) wurden hinsichtlich der Dauer ihrer Hauptbeschwerden befragt. Hierbei konnte unterschieden werden zwischen dauerhaften Beschwerden, unregelmäßigem und phasenartigem Auftreten und kurzen Pausen. Die Beschwerden der symptomatischen Atopiker waren überwiegend durch Unterbrechungen (kurze Pausen) gekennzeichnet, während die Psoriasis Patienten dauerhafte Beschwerden angaben.

Hinsichtlich der Eigen- und Fremdanamnese wurde nach atopie-spezifischen Beschwerden in der Kindheit und bei Familienangehörigen gefragt. Es zeigte sich der eindeutige Trend, dass Atopiker bereits aus Familien stammten, wo mindestens ein Familienmitglied ebenfalls an einer Atopie litt. Die symptomatischen Atopiker gaben zu 91,6 % und die asymptomatischen Atopiker zu 63,6 % eine positive Familienanamnese an. Von den Psoriasis Patienten gaben immerhin 38,5 % eine positive Familienanamnese hinsichtlich einer Atopie an, während es in der Gruppe der NA 35,7 % der Befragten waren. Ebenso bemerkten 83,3 % der SA bereits Symptome in der Kindheit. 27,3 % der AA hatten ebenfalls Symptome in der Kindheit bemerkt, die im Zeitraum von mehreren Jahren vor der Untersuchung nicht mehr auftraten. Auch 7 % der Psoriasis Patienten hatten in der Kindheit Symptome einer Atopie bemerkt, aber keine Atopie entwickelt.

Vollständigkeitshalber wurden die Psoriasis Patienten hinsichtlich der Expositionslokalisation von Hautveränderungen (Plaques) und auslösenden Faktoren befragt und untersucht. Bei der Auswertung waren Mehrfachantworten möglich (siehe Tab. 6).

**Tab. 6: Expositionslokalisation in %**

Die Psoriasis Patienten wurden zur Expositionslokalisation der Plaques befragt. Hierbei waren auch Mehrfachantworten möglich, da jeden Patienten mehrere Expositionslokalisation betreffen konnten. Es fiel eine deutliche Betonung der Extremitäten auf.

		Antworten		Prozent der Fälle
		H	Prozent	
Expositionslokalisation	Exposition_Arm	11	28,9 %	84,6 %
	Exposition_Bein	10	26,3 %	76,9 %
	Exposition_Kopf	8	21,1 %	61,5 %
	Exposition_Stamm	9	23,7 %	69,2 %
Gesamtsumme		38	100,0 %	292,3 %

Als Hauptauslöser mit 46,7 % wurde Stress von den Patienten benannt. Der Auslöser Hitze wird von 4 Patienten (also 26,7 %) benannt, während 5 Patienten gar keinen Auslöser benennen konnten.

**4.4 Gesamt-IgE und spezifisches IgE**

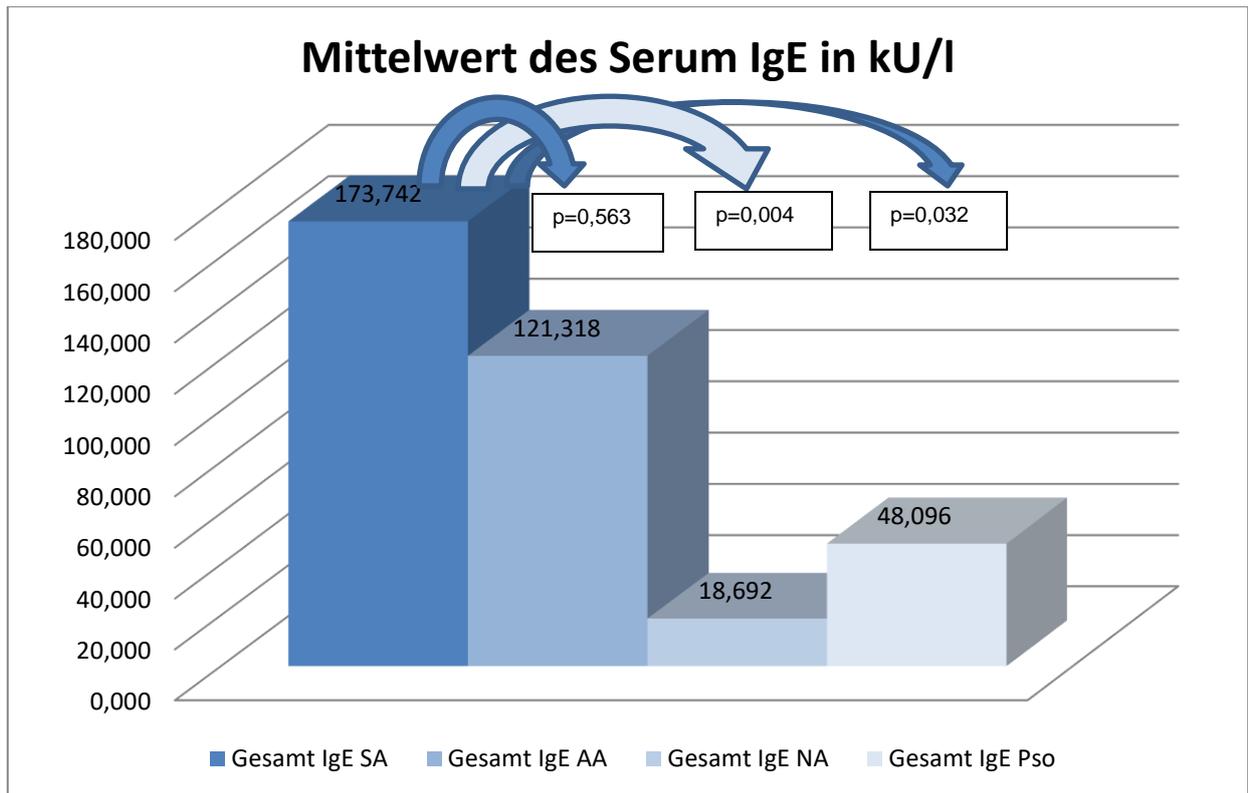
Neben dem Untersuchungsschwerpunkt dieser Arbeit, der mRNA Expressionsanalyse der Toll-like-Rezeptoren-2, -4, -9, wurden für die Probandenuntergruppen Gesamt-IgE und spezifisches IgE im Serum bestimmt (Tab. 7). Der Mittelwert des Gesamt-IgE-Serumspiegels war in der SA-Gruppe mit 173,7 kU/l am höchsten. Der Mittelwert des Gesamt-IgE in der AA-Gruppe war mit 121,3 kU/l nicht signifikant ( $p=0,563$ ) niedriger.

**Tab. 7: Probandenübersicht Gesamt-IgE im Serum in kU/l**

In der Tabelle sind die Gesamt-IgE Werte jedes Probanden nach Gruppen sortiert aufgeführt. Zusammenfassend wurden der Mittelwert und die Standardabweichung für jede Probandengruppe bestimmt.

Gesamt-IgE SA	Gesamt-IgE AA	Gesamt-IgE NA	Gesamt-IgE P	Probandennr.
129	41	1	20,4	1
114	16,4	56,3	9,5	2
48,4	68,6	4,04	26	3
71,1	290	79,4	119	4
334	41,8	1,36	1,41	5
169	30,1	75,2	197	6
52,3	67,6	6,08	5,62	7
29,2	112	5,94	2,33	8
30,3	27	5,48	52,2	9
412	223	13,7	26,7	10
599	417	1	68,9	11
96,6		11,1		12
		0		13
		1,09		14
173,742	121,318	18,692	48,096	MW
180,227	131,518	28,652	60,770	SD

SA = symptomatische Atopiker  
 AA = asymptomatische Atopiker (AA)  
 NA = Nicht-Atopiker  
 P = Psoriasis Patienten  
 IgE = Immunglobulin des Typ E  
 MW = Mittelwert  
 SD = Standardabweichung



**Abb. 6: Graphische Darstellung der Mittelwerte des Gesamt Serum IgE in kU/l** aufgeteilt nach den einzelnen Probandengruppen der symptomatischen Atopiker (SA), asymptomatischen Atopiker (AA), Nicht-Atopikern (NA) und Psoriasis Patienten (Pso). Um darzustellen, ob die Mittelwerte der Gruppen einen signifikanten Unterschied zueinander aufweisen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit einem angeschlossenen post-hoc T-Test durchgeführt. Die p-Werte des post-hoc Tests wurden nach Dunnett korrigiert und die Probandengruppe SA als Referenz ausgewählt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Gesamt-IgE zwischen den Gruppen SA und NA, sowie zwischen SA und P. Zwischen den Atopikern besteht kein signifikanter Unterschied im Gesamt Serum IgE.

Neben den anamnestischen Angaben bezüglich des klinischen Vorliegens einer Typ-I Sensibilisierung, wurde das spezifische IgE gegen acht der am häufigsten vorkommenden inhalativen Allergene (Dermatophyten, Katzenhaare, Roggen, Lieschgras, Erle, Birke, Hasel und Beifuß) mittels RAST im Serum bestimmt. Für Probanden der Kontrollgruppen (NA und P) war die Angabe einer klinischen Manifestation einer Typ-I Sensibilisierung oder Nachweis von spezifischem IgE  $>0,35$  kU/l ( $>$  CAP-Klasse 0) ein Ausschlusskriterium. Der Vergleich, ob die Mittelwerte der spezifischen IgE Level unterscheiden, wurde daher nur zwischen den beiden Atopiker-Gruppen geführt. Das spezifische IgE zeigte in beiden Atopiker-Gruppen die höchsten Einzel- und Mittelwerte für die Dermatophyten Untergruppe pteronyssinus. Der Mittelwert in der Gruppe der SA

(Mittelwert: 24,29 kU/l) war 8-fach höher als in der Gruppe der AA (Mittelwert: 3,67 kU/l) und erreichte damit einen signifikanten Unterschied ( $p=0,043$ ). Auch die Mittelwerte (vgl. Tab. 8) der spezifischen IgE-Werte für Roggen, Lieschgras, Erle, Birke und Hasel lagen in der Gruppe der SA im Mittel um ein vielfaches höher als in der Gruppe der AA. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich von SA und AA bei den Frühblühern (Birke:  $p=0,02$ , Erle:  $p=0,048$ , Hasel  $p=0,048$ ). Auch die Sensibilisierung gegen Katzenhaare wies einen signifikanten Unterschied zwischen SA und AA auf, da interessanterweise in der Gruppe der AA keine Sensibilisierung für Katzenhaare und Beifuß nachzuweisen war.

**Tab. 8: Mittelwerte des Spezifischen IgE Level (kU/l)** im Vergleich von Symptomatischen Atopikern (SA), Asymptomatischen Atopikern (AA), Nicht-Atopikern (NA) und Psoriasis (P) Probanden. Die aufgeführten Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Der T-Test ermittelt die Signifikanz zwischen den Probandengruppen SA und AA. Es wird ein zweiseitiger T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese lautet, dass es keinen Unterschied in den Mittelwerten der spezifischen IgE Level zwischen den SA und AA gibt. Der P-Wert gibt an, dass die Nullhypothese unterhalb der 5 %-Grenze  $p < 0,05$ , abgelehnt werden kann. \* bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte für die Probandengruppen SA und AA bei  $p < 0,05$  vorliegt.

Allergen	SA (n=12)	AA (n=11)	NA (n=14)	P (n=13)	P-Wert
Derm. p.	24,29±33,14	3,67±6,3	0,02±0,08	0	0,043*
Derm. f.	22,09±30,48	4,8±8,25	0,02±0,06	0	0,081
Katzenhaare	25,17±32,63	0	0	0	0,000*
Birke	34,5±43,2	1,55±4,8	0	0	0,02 *
Erle	14,42±22,1	0,35±1,13	0	0	0,048 *
Hasel	4,26±6,58	0,09±0,2	0	0	0,048 *
Roggen	11,55±21,18	0,4±0,81	0	0	0,096
Lieschgras	14,46±25,19	0,44±0,83	0	0	0,08
Beifuß	0,81±2,29	0	0	0	0,000*

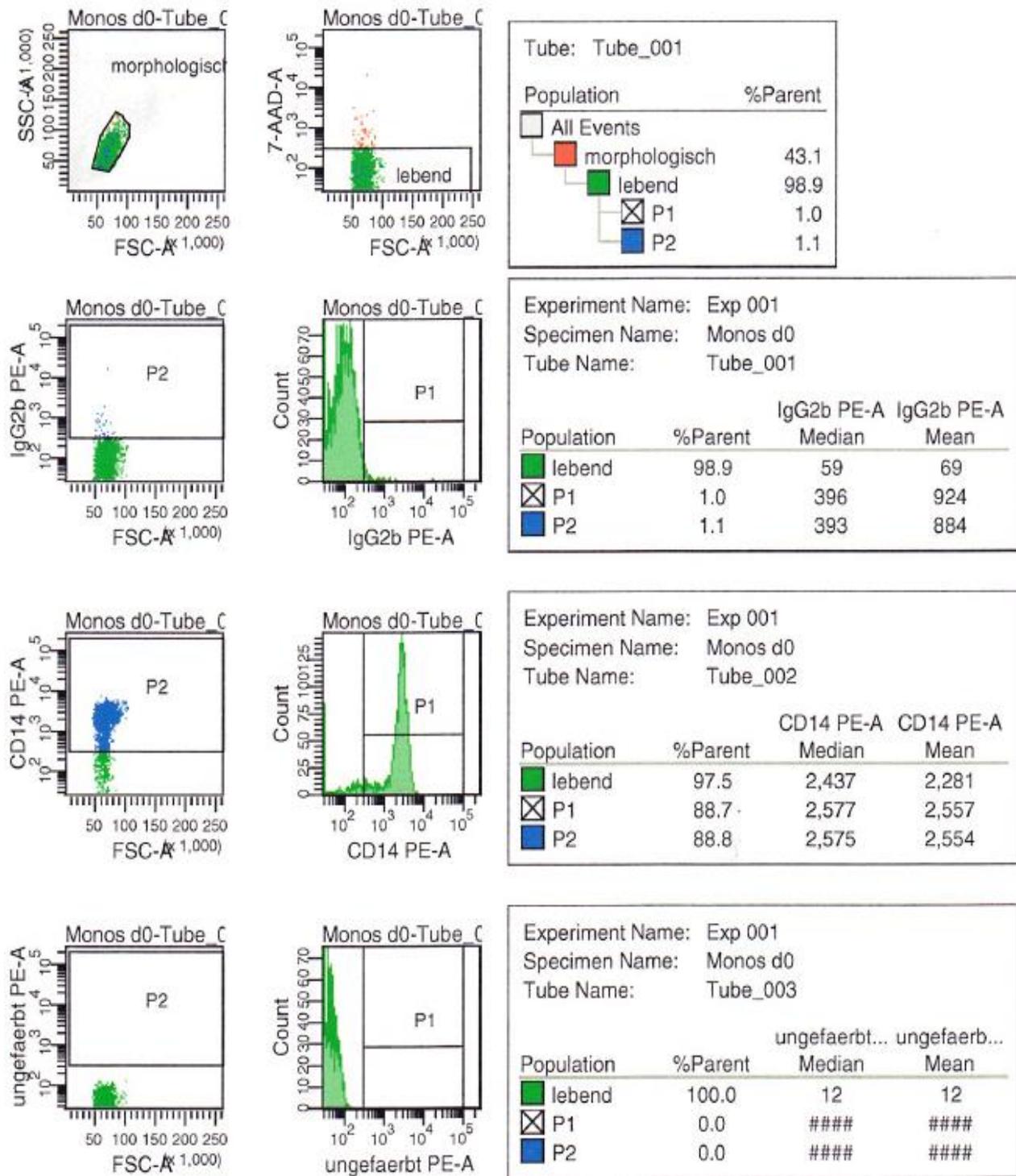
#### 4.5 Reinheit der Zellen

Nach der Isolation der mononukleären Zellen aus peripherem Blut, wurde stets eine FACS-Analyse durchgeführt, um die Reinheit der Zellpopulation zu überprüfen. Dazu wurden Antikörper gegen humanes CD 14, 7-AAD und der IgG2b-Isotypenkontrolle verwendet (Abb.7). Entsprechend wurde die Reinheit der kultivierten DCs anhand der Antikörper gegen CD1a, 7-AAD und der IgG1-Isotypenkontrolle überprüft (Abb.8). Die lebenden und CD14 positiven Monozyten wurden durch eine Kombination aus *forward* und *side scatter* (FSC/SSC) morphologisch aus CD14/7-AAD gruppiert. Die Fluoreszenz-Intensität der verwendeten Antikörper wurde aus dem relativen Fluoreszenz-Index (rFI) bestimmt. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der einzelnen Antikörper wurde anhand der Auswertungsgraphen abgelesen.

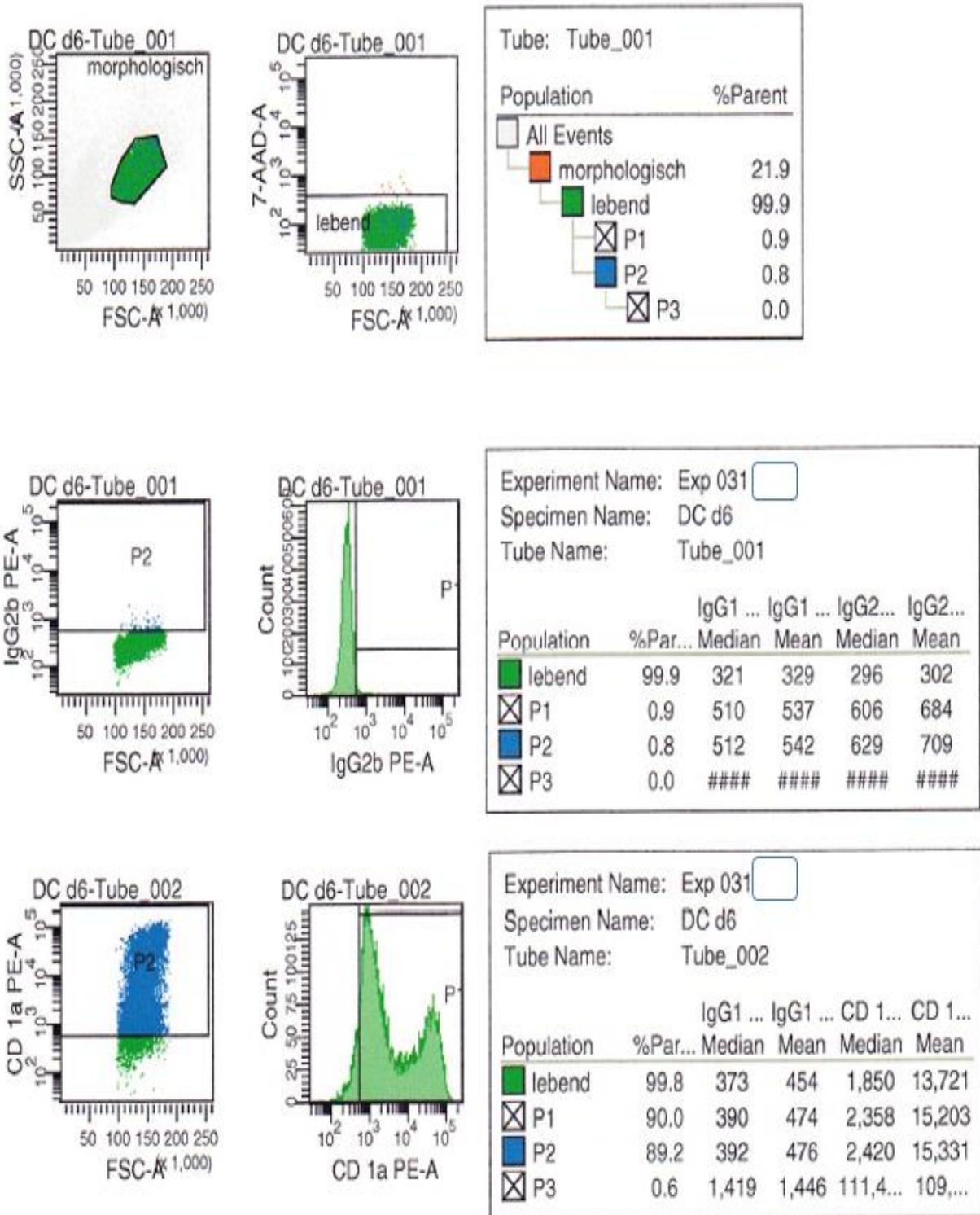
$$\text{rFI} = [\text{MFI (Antigen)} - \text{MFI (Isotypenkontrolle)}] : \text{MFI (Isotypenkontrolle)}$$

Abbildung 7 zeigt die Auswertung anhand einer exemplarischen FACS-Analyse der isolierten Monozyten. Im Tube 1 werden zunächst die Monozyten anhand ihrer morphologischen Struktur (Größe und Streuungsverhalten) eingegrenzt. Dann wird anhand des Antikörpers gegen 7-AAD (7-amino-actinomycin D), der von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird, zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden. Die Isotypenkontrolle IgG2b lässt sich im Tube 1 nachweisen. Die zu beobachtende Population P1 wird so eingegrenzt, dass maximal 1 % der IgG2b positiven Zellen im Messfenster liegen. Tube 2 enthält den PE-gekoppelten-Antikörper gegen CD 14, der an CD 14+ Monozyten bindet. Anhand der FACS-Analyse kann die Anzahl der CD 14+ Monozyten auf der Y-Achse je Fluoreszenzintensität auf der X-Achse gemessen werden. In der unten abgebildeten Analyse sind 88,7 % der gemessenen Monozyten CD14+ und lebend. Sie weisen eine mittlere Fluoreszenz von 2.577 FU auf. In dem Tube 3 wird eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt.

Die FACS-Analyse zeigte eine durchschnittliche Reinheit von 90,4 % für die CD 14+ Monozyten und von 79,8 % für die CD1a+ Dendritischen Zellen. Zwischen den einzelnen Probandengruppen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Reinheit für CD14+ Monozyten und CD1a+ DCs.



**Abb. 7:** Auswertung der Zellreinheit anhand einer exemplarischen fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse der isolierten Monozyten. Es werden 3 Tubes mit ca 100.000 Monozyten in FACS- Puffer befüllt. Dem 1. Tube werden die Antikörper 7-AAD und die Isotopenkontrolle IgG2b zugefügt, um nachzuweisen, dass es sich bei den eingegrenzten Zellen um Monozyten handelt. Dem 2. Tube wird der Antikörper gegen CD14 zugefügt, um nachzuweisen, dass es sich um CD 14+ Monozyten handelt. In dem 3. Tube wird eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt.



**Abb. 8:** Auswertung der Zellreinheit anhand einer exemplarischen fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse der kultivierten DCs an Tag 6. Es werden 3 Tubes mit ca 100.000 DCs in FACS- Puffer befüllt. Dem 1. Tube werden die Antikörper 7-AAD und die Isotopenkontrolle IgG1 und IgG2b zugefügt, um nachzuweisen, dass es sich bei den eingegrenzten Zellen um DCs handelt. Dem 2. Tube wird der Antikörper gegen CD1a zugefügt, um nachzuweisen, dass es sich um CD 1a DCs handelt.

## 4.6 Expressionsmuster von TLR-2, -4, -9

Die quantitative Real-Time-PCR wurde durchgeführt, um die Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene zu erheben. Eine detaillierte Beschreibung der Untersuchungsmethode ist unter Kapitel 4.2.7 aufgeführt. Es wurden forward und reverse Primer für die charakteristischen Nukleotidabfolgen der TLRs hergestellt, diese sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Monozyten und DCs wurden, wie oben beschrieben, isoliert und kultiviert und die Rezeptorexpression wurde ohne vorangegangene Stimulation gemessen.

### 4.6.1 Toll-like-Rezeptor-2

#### 4.6.1.1 Expression von TLR-2 (mRNA) in Monozyten des peripheren Blutes

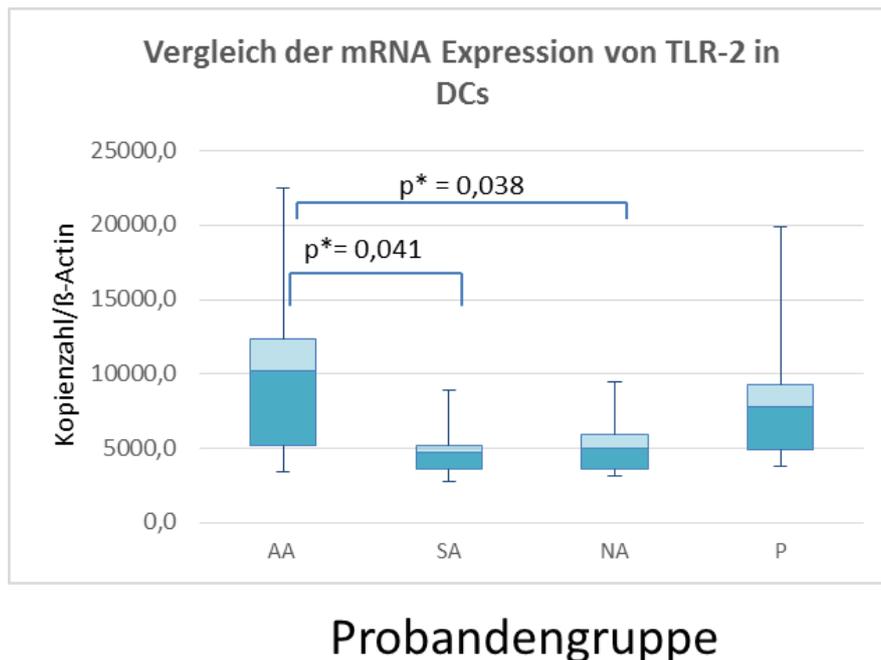
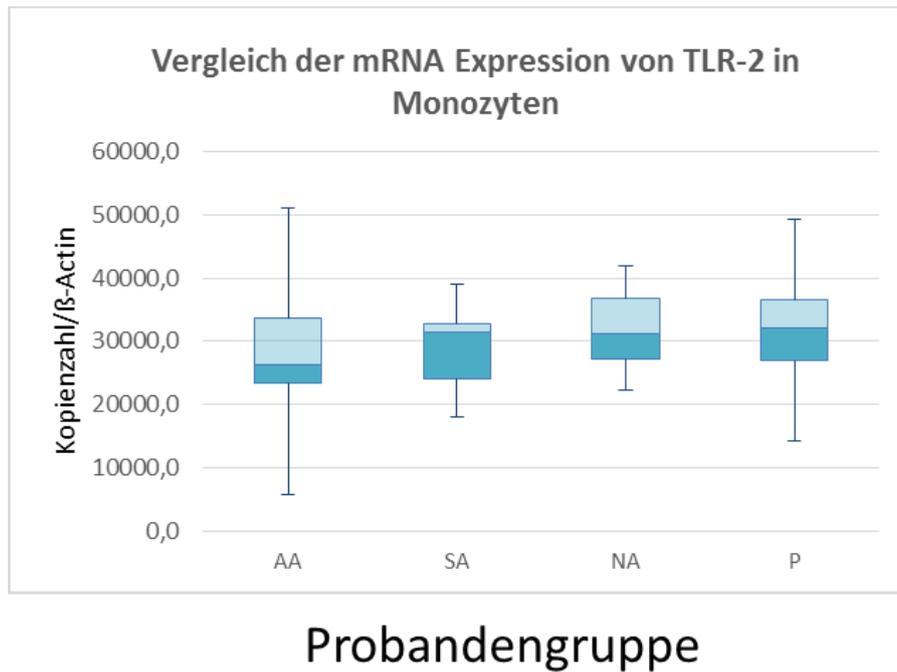
Eine hohe TLR-2-Expression ist charakteristisch für Monozyten (Hornung et al., 2002b). Die TLR-2 Expression wurde bei AA=9, SA=12, NA=14 und P=13 untersucht. Die mRNA Expression von TLR-2 war stark und gleichmäßig in allen vier Probandengruppen nachweisbar. Bei der relativen Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens (TLR-2) zunächst auf ein konstant exprimiertes Referenzgen ( $\beta$ -Actin) normalisiert. 4

**Tab. 9: mRNA Kopienzahlen von TLR-2 und seinem Referenzgen  $\beta$ -Actin in Monozyten** (MW = Mittelwert, SD= Standardabweichung)

Die mRNA Kopienzahl von TLR-2 wurde mittels RT-PCR ermittelt und auf das konstant exprimierte Referenzgen  $\beta$ -Actin normalisiert.

Typ	MW $\pm$ SD der Kopienzahl $\beta$ -Actin	MW $\pm$ SD der Kopienzahl TLR2	MW $\pm$ SD der TLR2-Kopien/Actinkopien*1E6
AA	6.012.778 $\pm$ 2.817.877	156.144 $\pm$ 113.506	26.401 $\pm$ 10.951
SA	6.157.455 $\pm$ 5.437.666	174.808 $\pm$ 137.807	31.421 $\pm$ 11.383
NA	5.871.429 $\pm$ 3.265.427	179.864 $\pm$ 95.326	31.315 $\pm$ 6.365
P	6.911.000 $\pm$ 2.869.290	211.866 $\pm$ 123.690	32.056 $\pm$ 9.523

Die TLR-2 mRNA Expression in Monozyten war in allen vier Gruppen gegenüber der mRNA Expression in DCs erhöht, allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Auch die Streuung zwischen den Gruppen war homogen.



**Abb. 9: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-2 in Monozyten und DCs normalisiert auf das Referenzgen  $\beta$ -Actin.** Die Abbildung zeigt die TLR-2 Expression zwischen Monozyten (oben) und DCs (unten). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den 25 %- (hellblau) und 75 % Quantilen (blau). Die Fehlerindikatoren markieren die Ausreißer im Bereich Minimum und Maximum. Nach einfaktorieller Varianzanalyse mit post-hoc T-Test über alle Gruppen, wurde die Signifikanz mittels zweiseitigen T-Tests für unabhängige Stichproben erhoben. Der P-Wert gibt an, dass die Nullhypothese unterhalb der 5 %-Grenze  $p < 0,05$ , abgelehnt werden kann. \* bedeutet signifikanter Unterschied der Mittelwerte für die verglichenen Probandengruppen.

Abbildung 9 zeigt die Expression von TLR-2 auf mRNA Ebene in Monozyten (oben) und DCs (unten) von asymptomatischen Atopikern (AA), Nicht-Atopikern (NA), Psoriasis Patienten (P) und symptomatischen Atopikern (SA). Die mRNA Expression wurde mittels Real-Time-PCR ermittelt. Die Kopienanzahl wurde gegenüber dem Referenzgen ( $\beta$ -Actin)  $1 \times 10^6$  relativiert. Im Vergleich der mRNA Expression in Monozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Probandengruppen. Im Vergleich der mRNA Expression in DCs ist der Mittelwert der Kopienzahl für NA und SA signifikant geringer gegenüber dem Mittelwert, den die AA erzielten.

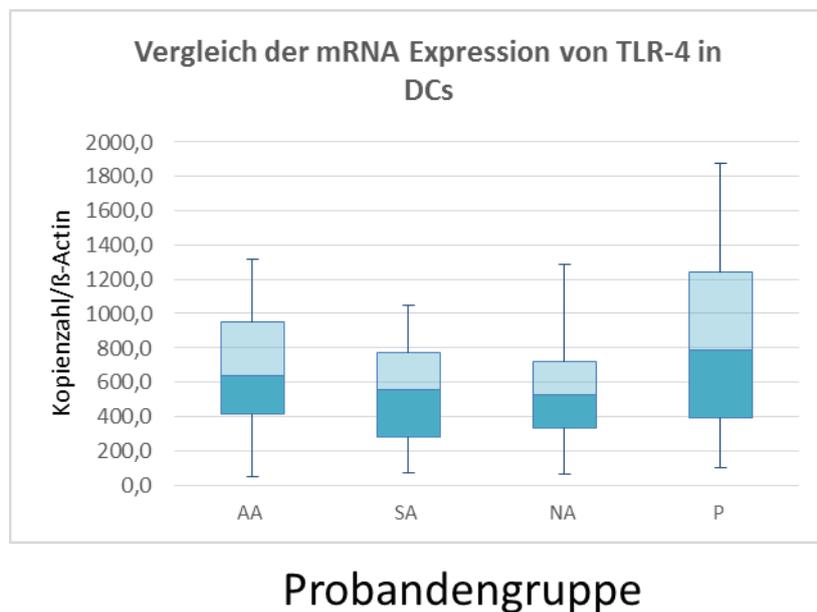
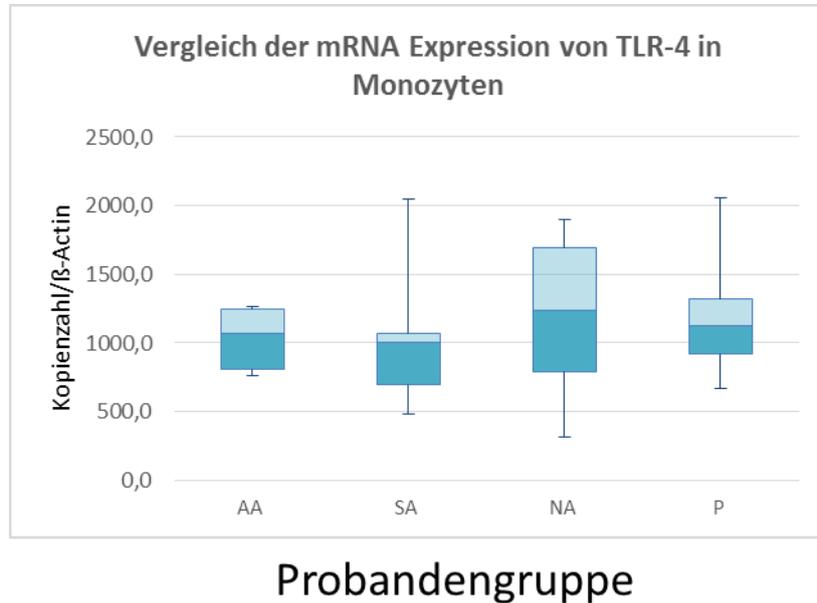
#### 4.6.1.2 Expression von TLR-2 (mRNA) in Dendritischen Zellen

Bei den in dieser Arbeit getesteten Toll-like-Rezeptoren zeigte sich der größte Unterschied der mRNA Expressionslevel für TLR-2 auf DCs. Die Daten sind in der Abb. 12 dargestellt.

Die mittlere TLR-2 mRNA Expression war für AA und P am höchsten, während sowohl die Gruppe der SA und NA ähnliche niedrige Expressionslevel aufwies. Die mittlere mRNA Kopienzahl lag für die Gruppe der AA bei 10.206,8 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien und die der Psoriasis Patienten bei 10.351,9 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien. Im Vergleich dazu waren die mittleren mRNA Kopienzahlen für TLR-2 in der Gruppe der SA und NA um ca. 50 % niedriger. Die mittlere mRNA Expression von TLR-2 lag in der Gruppe der SA bei 4.756,2 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien, während sie in der Gruppe der NA mit 4.974,9 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien etwas höher verzeichnet war. Die mittlere mRNA Expression von TLR-2 wies in DCs also signifikant niedrigere Level zwischen AA und NA ( $p=0,0387$ ), sowie AA und SA ( $p=0,041$ ) auf. Die zugrundeliegenden Daten verdeutlichten, dass auch auf mRNA Ebene eine Unterscheidung zwischen den Probandengruppen möglich war. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der zweiseitige T-Tests für unabhängige Stichproben herangezogen, womit die mittlere mRNA Expression von TLR-2 verglichen wurde. Einzelne Ausreißer in der Gruppe der SA und NA erreichten zwar höhere mRNA TLR-2-Expressionslevel, erreichten aber nicht, bzw. kaum das mittlere Expressionslevel der Vergleichsgruppen der AA und P. Denn auch das mittlere TLR-2-Expressionslevel in DCs von Psoriasis Patienten war deutlich gegenüber dem mittlere TLR-2-Expressionslevel der SA und NA erhöht, erreichte allerdings keine signifikanten Werte ( $p=0,099$  im Vergleich zu SA und  $p=0,094$  im Vergleich zu NA).

## 4.6.2 Toll-like Rezeptor-4

### 4.6.2.1 Expression von TLR-4 (mRNA) in Monozyten des peripheren Blutes



**Abb. 10: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-4 in Monozyten und DCs normalisiert auf das Referenzgen  $\beta$ -Actin.** Die Abbildung vergleicht die Expression und Kinetik der mRNA von TLR-4 in den Probandengruppen asymptotischen Atopikern (AA), Nicht-Atopikern (NA), Psoriasis Patienten (P) und symptomatischen Atopikern (SA). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den 25 %- (hellblau) und 75 % Quantilen (blau). Die Fehlerindikatoren markieren die Ausreißer im Bereich Minimum und Maximum.

Die TLR-4 mRNA Expression wurde bei AA=9, SA=12, NA=14 und P=12 bestimmt. Die mRNA Expression war gleichmäßig verteilt und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Probandengruppen. Der Mittelwert der mRNA Expression in Monozyten lag in der Gruppe der NA mit 1.235,39 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien am höchsten. Es folgten die Gruppe der Psoriasis Patienten mit 1.126,61 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien, die Gruppe der AA mit 1.067,6 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien und die SA mit 999,06 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien. Die mittlere mRNA Expression von TLR-4 wies im direkten Vergleich zwischen den einzelnen Probandengruppen keine signifikanten Expressionsunterschiede auf.

#### **4.6.2.2 Expression von TLR-4 (mRNA) in Dendritischen Zellen**

Unerwarteter Weise zeigte sich bei dem Toll-like-Rezeptor-4, der charakteristischerweise durch bakterielles LPS stimuliert wird, kein signifikanter Unterschied in der mittleren mRNA Expression für TLR-4 in DCs. Jedoch war hier die Varianz zwischen den einzelnen Probanden groß. Innerhalb der einzelnen Probandengruppen fiel eine große Spannweite zwischen der minimalen und maximalen mRNA Kopienzahl auf. In jeder Probandengruppe ließen sich Probanden mit mRNA Kopienzahlen unter 100 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien verzeichnen, während die maximalen Kopienzahlen bei 1000 - 2000 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien lagen.

Der Mittelwert war in der Gruppe der Psoriasis Patienten mit 789,14 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien am höchsten. Es folgten die Gruppe der AA mit 637,0 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien, die NA mit 529,87 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien und schließlich die SA mit 555,58 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien im Mittel.

#### **4.6.3 Toll-like Rezeptor-9**

##### **4.6.3.1 Expression von TLR-9 (mRNA) in Monozyten und Dendritischen Zellen des peripheren Blutes**

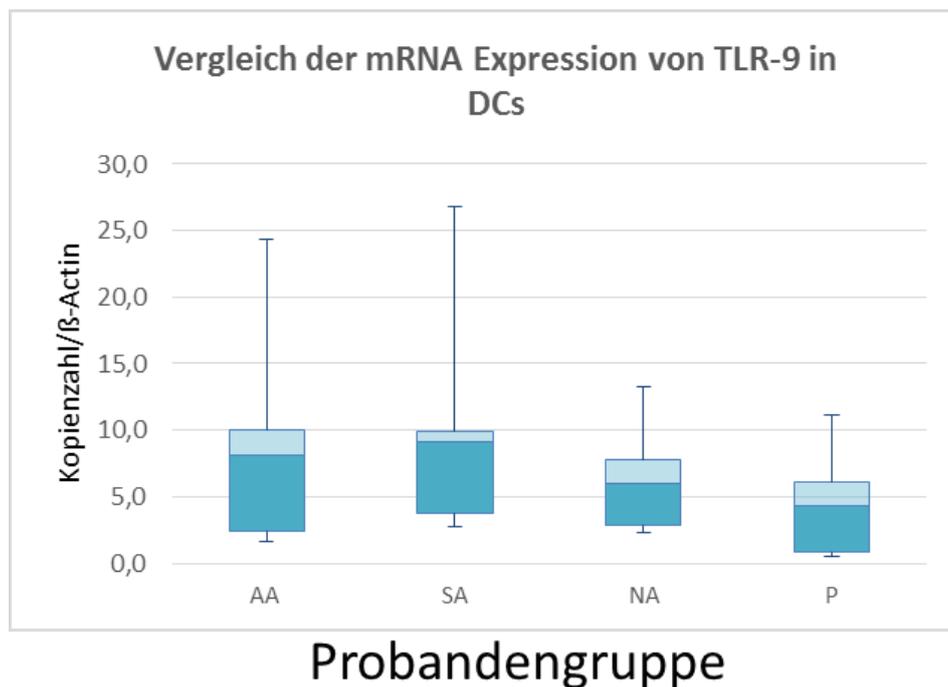
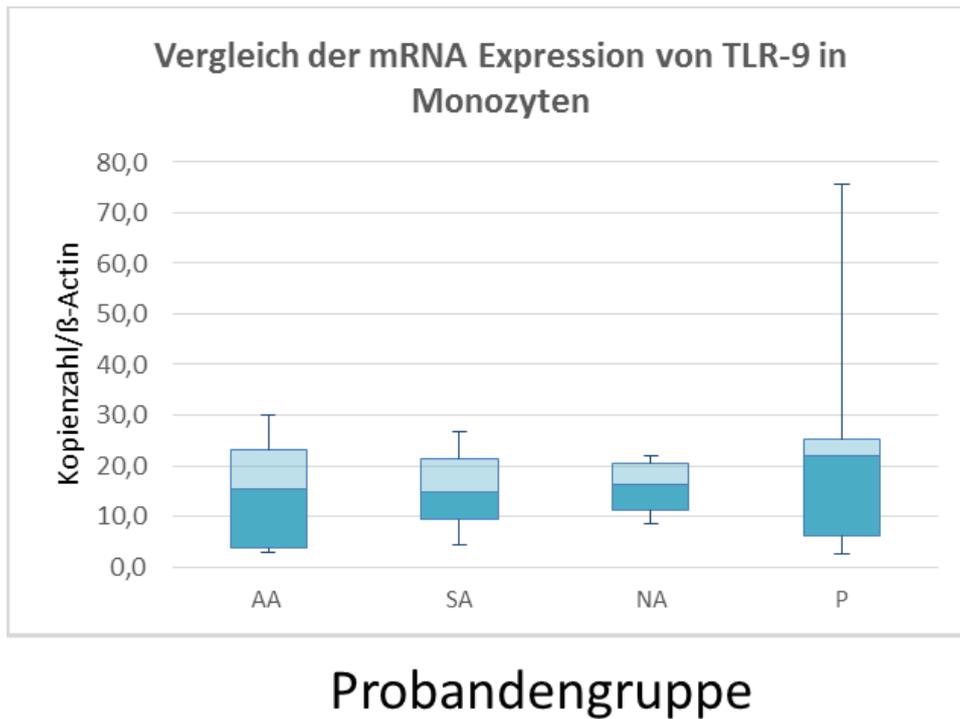
Die TLR-9 mRNA Expression wurde bei AA=5, SA=6, NA=6 und P=7 bestimmt. Im Gegensatz zu den Daten über TLR-2 und TLR-4 war die mRNA Expression von TLR-9 in allen untersuchten Gruppen niedrig und unterschied sich nicht signifikant zwischen Monozyten und DCs (Abb. 14).

Der Mittelwert der mRNA Expression in Monozyten lag in der Gruppe der Psoriasis Patienten mit 21,82 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien am höchsten. Es folgten die Gruppe der NA mit 16,29 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien, die Gruppe der AA mit 15,33 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien

und die SA mit 14,75 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien. Einen signifikanten Unterschied im Vergleich der mRNA Expressionsmittelwerte zwischen den einzelnen Gruppen konnte mit dem zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben nicht nachgewiesen werden.

Ebenso verhielten sich die Ergebnisse für die mRNA Expression von TLR-9 in DCs, wobei hier die Expression mit 9,14 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien in der Gruppe der SA am höchsten war. Es folgten die Gruppe der AA mit 8,15 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien, die NA mit 5,92 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien und schließlich die P mit 4,26 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien.

Auch während der Entwicklung von Monozyten zu DCs kam es zu keiner signifikanten Reduktion der mRNA Kopienzahlen.



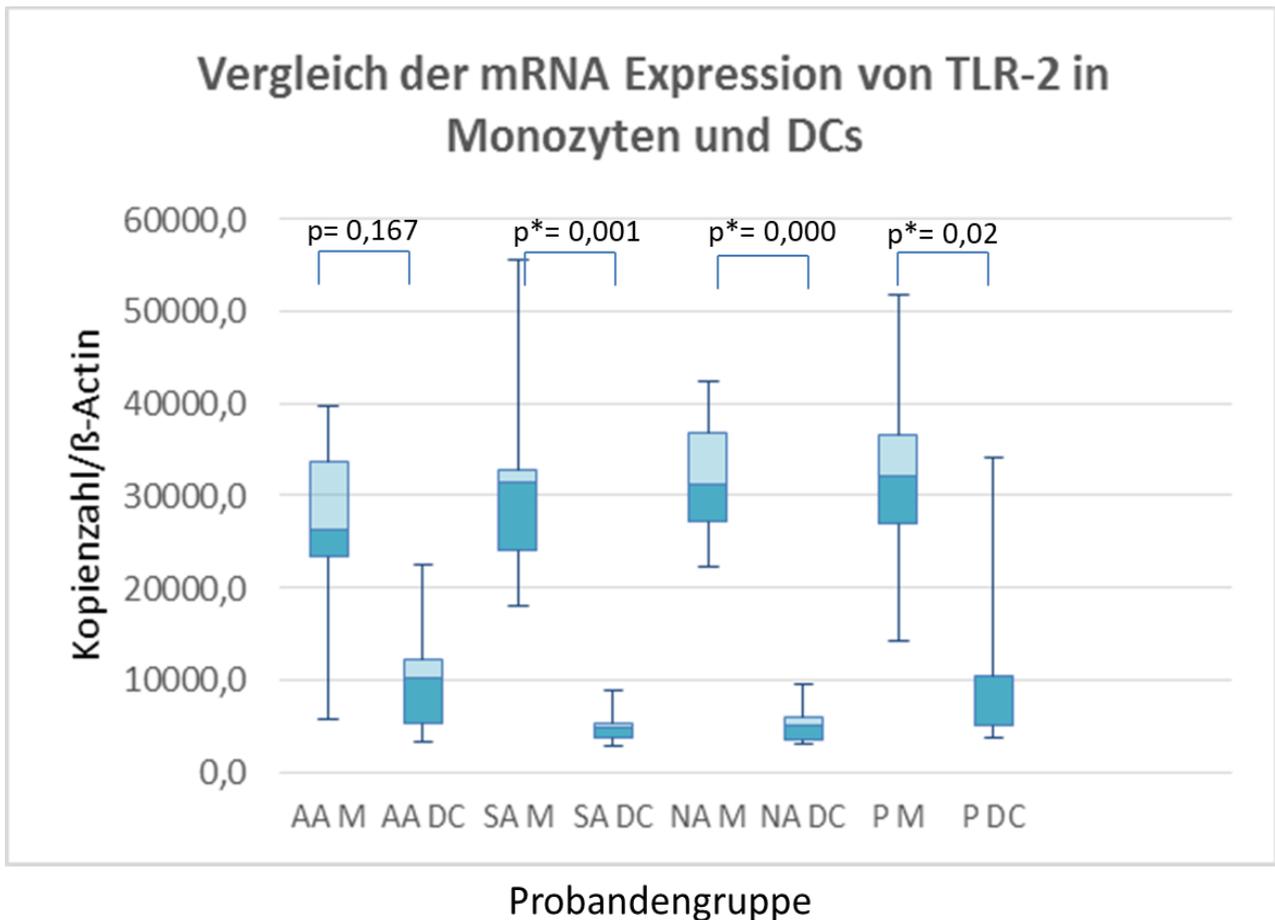
**Abb. 11: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-9 in Monozyten und DCs normalisiert auf das Referenzgen  $\beta$ -Actin.** Die Abbildung vergleicht die Expression und Kinetik der mRNA von TLR-9 in den Probandengruppen asymptotischen Atopikern (AA), Nicht-Atopikern (NA), Psoriasis Patienten (P) und symptomatischen Atopikern (SA). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den 25 %- (hellblau) und 75 % Quantilen (blau). Die Fehlerindikatoren markieren die Ausreißer im Bereich Minimum und Maximum.

#### 4.6.4 Veränderung der TLR-Expressionsmuster während der Differenzierung zu Dendritischen Zellen

Anhand der Daten zum Vergleich der mRNA Expression der TLR-2, -4 und -9 zwischen AA, SA, NA und Psoriasis Patienten, lässt sich zunächst allgemein eine Aussage zur mRNA Expression der untersuchten Rezeptoren auf Monozyten und DCs treffen. So war die mRNA Kopienzahl im Mittel für die untersuchten TLRs in allen vier Probandengruppen auf Monozyten höher als auf DCs. Bei der Reifung der Zellen wurde also die Rezeptorexpression der untersuchten TLRs herunter reguliert, wobei die Herabregulation der Rezeptorexpression für TLR-2 in den Gruppen der SA, NA und P signifikante Werte erreicht. Die geringste Herabregulation konnte man für die Gesamtgruppe der AA beobachten, wobei es hier individuelle Ausnahmen gab, die im Folgenden erläutert werden.

Das höchste mRNA Expressionsmuster wurde für TLR-2 in Monozyten registriert, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Probandengruppen gab. Bei der Differenzierung zu DCs blieb das Expressionslevel von TLR-2 in der Gruppe der AA und P deutlich erhöht, während sie in den Vergleichsgruppen der NA und SA abfielen. Es konnte beobachtet werden, dass die Herabregulation der TLR-2 mRNA Expression während der Differenzierung in den Probandengruppen von SA, NA und P signifikant war. In der Gruppe der AA gab es zwei Individuen, die sogar eine Expressionssteigerung bei der Differenzierung von Monozyten zur DCs aufwiesen. Während die mRNA Kopienzahl für TLR-2 in den untersuchten Monozyten bei 5.825 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien, bzw. 9.662 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien lag, wurde diese bei der Differenzierung zu DCs auf 22.549 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien, bzw. 22.511 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien im Schnitt etwa verdreifacht. Die anderen beobachteten Probanden der Gruppe AA zeigten eine deutlich mildere Herabregulation der TLR-2 mRNA Expression gegenüber den Vergleichsgruppen, sodass hier im Mittel kein signifikanter Wert mehr erreicht wurde ( $p=0,167$ ).

Die Expression von mRNA des TLR-4 in Monozyten war in den Probandengruppen gleichmäßig verteilt. Bei der Reifung zu DCs wurde die mittlere mRNA Expression leichtgradig reduziert, wobei einzelne Ausreißer durch eine deutliche Reduktion der mRNA Kopien auffielen. Im Mittel wurde nur bei der Gruppe der NA eine signifikante Reduktion der mRNA Kopien für TLR-4 während der Entwicklung zu DCs gemessen.

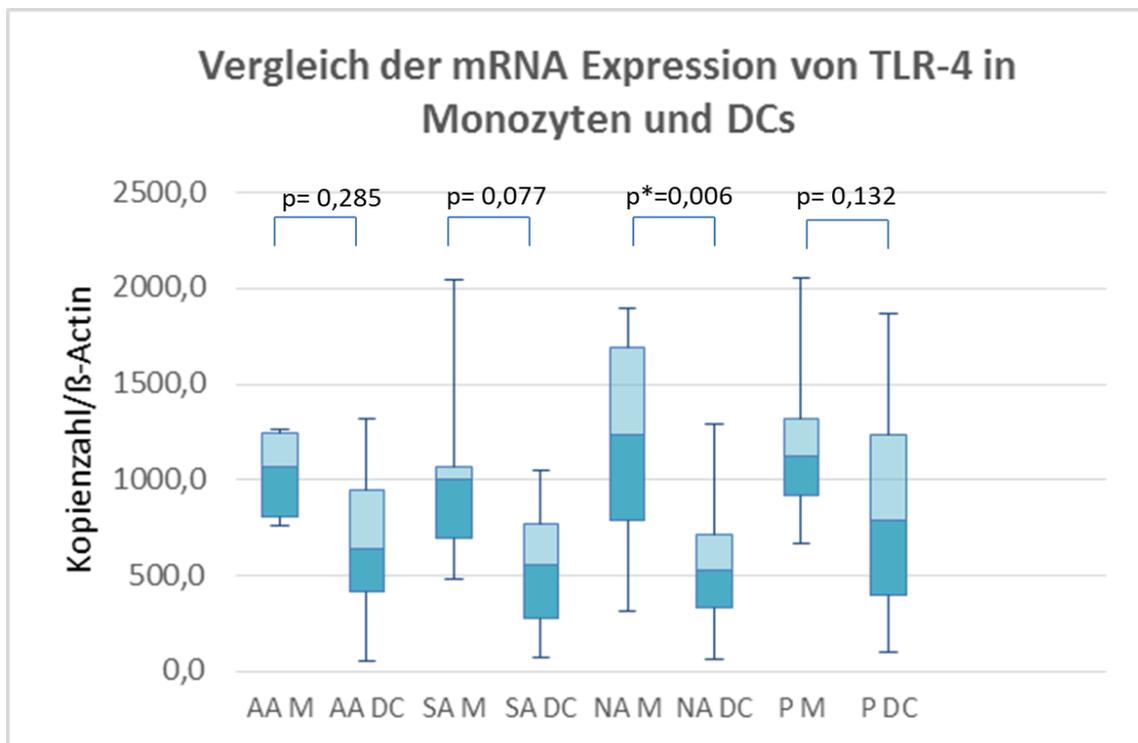


**Abb. 12: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-2 in Monozyten und DCs.** Die Abbildung zeigt die Kinetik der TLR-2 Expression zwischen Monozyten (M) und DCs (DC). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den 25 %- (hellblau) und 75 % Quantilen (blau). Die Fehlerindikatoren markieren die Ausreißer im Bereich Minimum und Maximum. Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung und post-hoc T-Test für gepaarte Stichproben mit korrigierten p-Werten nach Bonferroni erfasst. Die Nullhypothese lautet, dass es keinen Unterschied in der Expressionsregulation für die Probandengruppen gibt. Der p-Wert gibt an, dass die Nullhypothese unterhalb der 5%-Grenze  $p < 0,05$ , abgelehnt werden kann.

\* bedeutet signifikanter Unterschied der Mittelwerte für die verglichenen Probandengruppen. Im Vergleich zeigt sich eine signifikante Herabregulation der Kopien für die Probandengruppe der NA, SA und P, während die Gruppen der AA keine signifikante Veränderung in der Kinetik zeigt.

Die Mittelwerte der mRNA Kopien in Monozyten der einzelnen Gruppen waren höher als der Mittelwert der mRNA Kopien in DCs. Vergleicht man nun die Differenz der mittleren TLR-4 mRNA Expression zwischen Monozyten und DCs, so zeigte sich die größte Abweichung in der Gruppe der Nicht- Atopiker. Die mRNA Expression des TLR-4 reduzierte sich auf mehr als die Hälfte in den DCs (1.235,39 Kopien/1xE<sup>6</sup> Actinkopien

gegenüber 529,87 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien). Unter Anwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung entsprach das einer signifikanten Reduktion von  $p=0,006$ . Ebenfalls reduzierte sich der Mittelwert der mRNA Expression von TLR-4 in der Gruppe der SA von 999,06 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien um etwas weniger als die Hälfte auf 555,58 Kopien/ $1 \times 10^6$  Actinkopien, wobei hier gerade keine Signifikanz mit  $p=0,077$  verzeichnet werden konnte. Auch der Expressionsunterschied zwischen Monozyten und DCs war für die Psoriasis Patienten mit  $p=0,132$  und der AA mit  $p=0,285$  konnte keinen signifikanten Unterschied in der mRNA Expression erreichen.



**Abb. 13: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-4 in Monozyten und DCs normalisiert auf das Referenzgen  $\beta$ -Actin.** Die Abbildung zeigt die Kinetik der TLR-4 Expression zwischen Monozyten (M) und DCs (DC). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den 25 %- (hellblau) und 75 % Quantilen (blau). Die Fehlerindikatoren markieren die Ausreißer im Bereich Minimum und Maximum.

Die Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung und post-hoc T-Test für gepaarte Stichproben mit korrigierten p-Werten nach Bonferroni erfasst. Die Nullhypothese lautet, dass es keinen Unterschied in der Expressionsregulation für die Probandengruppen gibt. Der p-Wert gibt an, dass die Nullhypothese unterhalb der 5%-Grenze  $p < 0,05$ , abgelehnt werden kann.

\* bedeutet signifikanter Unterschied der Mittelwerte für die verglichenen Probandengruppen. Im Vergleich zeigt sich nur eine signifikante Herabregulation der Kopien für die Probandengruppe der NA.

Die Kinetik der TLR-9 Expression zeigte in keiner der untersuchten Probandengruppen eine signifikante Veränderung der mRNA Kopien bei der Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen. Alle untersuchten Probanden zeigten eine geringgradige Herabregulation.

#### **4.7 Korrelation des Gesamt-IgE-Levels im Serum und der TLR Expression**

**Gesamt-IgE** Um einen Vergleich zwischen der TLR mRNA Expression in Monozyten, bzw. DCs und atopiespezifischen Faktoren, wie das Gesamt-IgE, spezifisches IgE oder Grad der Beschwerden, herzustellen, wurde eine Spearman-Rank-Korrelationsanalyse durchgeführt. Die Erhöhung des Gesamt-IgE bringt zum Ausdruck, dass eine Disposition für atopische Erkrankungen vorliegen könnte. Probanden, die keine Erhöhung des Gesamt-IgE und keine anamnestischen, atopiespezifischen Symptome aufwiesen, wurden als Nicht-Atopiker (NA) eingestuft. Die Probanden mit einer Erhöhung des Gesamt-IgE und Symptomen als symptomatische Atopiker (SA.). Die Gruppe der SA wies das höchste mittlere Gesamt-IgE-Level mit 173,74 kU/l auf, während die Gruppe der NA mit 18,55 kU/l durch das geringste Level gekennzeichnet war. Die mittlere mRNA Kopienzahl für TLR-2 in Monozyten, DCs und für TLR-4 in DCs war in den beiden Gruppen nahezu gleich hoch. Im Vergleich zwischen den Gruppen der SA und AA war das Gesamt-IgE- Level mit 121,32 kU/l nicht signifikant niedriger, während sich zwischen der mittleren TLR-2 Expression auf DCs ein signifikanter Unterschied zwischen AA und SA ( $p=0,042$ ) darstellen ließ. Es bestand eine starke Korrelation des Gesamt-IgE-Wertes mit der mRNA Expression von TLR-2 in DCs ( $r_s=0,683$ ;  $p=0,042$ ) und der TLR-4 Expression in DCs ( $r_s=0,7$ ;  $p=0,036$ ) für SA. Für die Gruppe der AA konnte keine Korrelation zwischen den Gesamt-IgE-Werten und der mRNA TLR-Expression verzeichnet werden. Ebenso bestand keine Korrelation zwischen der mRNA TLR-Expression von TLR-9 in Monozyten und der TLR-9 Expression in DCs mit dem Gesamt-IgE-Level der vier Probandengruppen.

**Tab. 10:** Korrelation zwischen Gesamt-IgE (in kU/l) und der TLR-2 Expression in Dendritischen Zellen (DC) bei symptomatischen Atopikern. Um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen der TLR-2 Expression auf Monozyten oder DCs mit atopie-typischen Symptomen gibt wurde eine Korrelation der mRNA Expression mit dem Gesamt IgE Level mittels Spearman-Rank-Test erfasst. Es zeigte sich eine Korrelation des Gesamt IgE Level und der TLR-2 Expression auf DCs bei SA mit  $r_s=0,683$ ;  $p=0,042$  in der oberen Tabelle und zwischen TLR-4 Expression auf DCs bei SA mit  $r_s= 0,7$ ;  $p=0,036$  in der unteren Tabelle.

			Gesamt-IgE	DCTLR2copies_Actin copies
Spear man-Rho	Gesamt IgE	Korrelationskoeffizient	1,000	0,683*
		Sig. (2-seitig)		0,042
		N	12	9
	DCTLR2 Copies/ Actincopies	Korrelationskoeffizient	0,683*	1,000
		Sig. (2-seitig)	0,042	
		N	9	9

			Gesamt-IgE	DCTLR4copies_Actin copies
Spear man- Rho	Gesamt IgE	Korrelationskoeffizient	1,000	0,700*
		Sig. (2-seitig)	.	0,036
		N	12	9
	DCTLR4 Copies/ Actincopie	Korrelationskoeffizient	0,700*	1,000
		Sig. (2-seitig)	0,036	.
		N	9	9

Auch die spezifischen IgE-Werte von Lieschgras, Hausstaubmilben, Birke und Katzenhaare korrelierten nicht mit der TLR-Expression der unterschiedlichen Probandengruppen.

Ebenso wenig zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Gesamt-IgE-Level und der subjektiv empfundenen Beschwerdestärke der saisonalen Symptome der symptomatischen Atopiker.

## 5. Diskussion

Die Rolle des angeborenen Immunsystems ist weit mehr als die Kontrolle der Pathogene bis das adaptive Immunsystem eingreift. Und diese Funktion ist unweigerlich mit dem Zusammenspiel von TLRs und DCs verbunden (Heine und Lien, 2003). DCs erkennen über die exprimierten TLRs die eingedrungenen Pathogene (Clark et al., 2000), durchlaufen einen Aktivierungs- und Reifungsprozess, der durch die Expression von MHC und den co-stimulierenden Molekülen CD80 und CD86 geprägt ist (Banchereau und Steinman, 1998). Sie migrieren in die drainierenden Lymphknoten, wo eine Aktivierung antigen-spezifischer naiver T-Lymphozyten erfolgt. Ihr immunmodulierendes Potential wird über die Produktion von Zytokinen, wie IL-12, die eine Immunantwort vom Th1-Typ induzieren, erzeugt. Während das Zytokin IL-4 zu einer Differenzierung zu Th2-Zellen führt, die wiederum IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren und genau das Zytokin-Milieu schaffen (Mosmann und Coffman, 1989), das für die Entwicklung einer allergischen Erkrankung verantwortlich ist. Diese wird ausgelöst durch die Induktion einer antigen-spezifischen IgE-Produktion, einer Akkumulation von eosinophilen Granulozyten und der Aktivierung von Mastzellen (Anderson und Coyle, 1994; Corry und Kheradmand, 1999). Entsprechend der Hygienehypothese wird angenommen, dass eine bakterielle Infektion zu einer Aktivierung verschiedener TLRs führt und somit eine antigen-spezifische Th1-Antwort in die Wege leitet. Ergänzend hierzu passt, dass MyD88-defiziente Mäuse, nicht in der Lage sind antigenspezifische Th1-Zellen zu aktivieren, während eine Th2-Antwort möglich ist (Schnare et al., 2001). Bei Erkrankungen des atopischen Formenkreises dominieren Th2-Zytokine die Immunantwort, erst im Verlauf tragen Th1-Zellen zur Chronifizierung der Erkrankung bei (Grewe et al., 1998). Allerdings kann auch die TLR-abhängige Signalkaskade, die zu einem Th1/Th2-Shift führt, von der Menge der TLR-Stimuli abhängig sein (Heine und Lien, 2003).

Eine weitere Hypothese basiert auf der Entdeckung, dass mikrobielle Pathogene (TLR-Liganden) eine Th1-Antwort hervorrufen, während die Eliminierung von eukaryotischen Pathogenen, wie Parasiten oder Würmern, einer Th2-Antwort bedürfen. Diese Pathogene, ähnlich wie Allergene, weisen möglicherweise keine TLR-Liganden auf, die einen Shift von Th2- zu Th1-Antwort bewirken können. Parasitäre Würmer gehen sogar noch einen Schritt darüber hinaus und dämpfen, durch hochaktive entzündungshemmende Moleküle, bei chronischen Infektionen die Th2- (wie auch Th1-) Immunantwort. Sie

besitzen somit trotz ihrer Fähigkeit zur Th2-Induktion und IgE-Produktion eine anti-allergische, bzw. antiinflammatorische Wirksamkeit, um sich und Ihren Wirt nicht zu schädigen (Schramm und Haas, 2010).

Die Entdeckung, dass eine TLR-Signalwirkung entscheidend für eine Th1/Th2-Antwort ist, eröffnet neue Strategien für die Entwicklung von Therapiekonzepten gegen allergische Erkrankungen, wie *Asthma bronchiale* (Zuany-Amorim et al., 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu untersuchen, inwiefern sich die TLR-Expression auf Monozyten und DCs zwischen symptomatischen und asymptomatischen Atopikern unterscheiden, um einen Aufschluss über kompensatorische Strategien zu gewinnen. Als Kontrollgruppen dienen Nicht-Atopiker und Psoriasis Patienten, um die Gemeinsamkeit der Atopiker gegenüber gesunden Probanden und Patienten mit Hauterkrankungen anderer Genese herauszustellen.

Im Folgenden sollen die Methodik und die Ergebnisse der Arbeit anhand von relevanter Literatur diskutiert werden.

## **5.1 Diskussion der Methodik**

### **5.1.1 Real-Time PCR-System zur Untersuchung der Expression der Toll-like-Rezeptoren**

Die Real-Time PCR ist eine spezifische Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Nur wenn das Probenmaterial die Zielsequenz aufweist, kann die Sonde hybridisiert werden und ein entsprechendes Fluoreszenzsignal erhalten werden. Die Daten der RT-PCR können als absolute oder relative Werte ausgewertet werden. Die absolute Quantifizierung schließt die Generierung einer Standardkurve ein, die auf eine bekannte Kopienzahl zurückgreift. Dagegen wird bei der relativen Analyse, die Veränderung im Expressionsniveau relativ zu einer experimentellen Kontrolle, dem Referenzgen, bestimmt (Winer et al., 1999). Für die meisten Forschungsanwendungen ist die relative Quantifizierung vorteilhafter, da die experimentellen Proben direkt mit der Kontrolle verglichen werden können (Peirson et al., 2003). Die Methode der relativen Quantifizierung beruht auf der Annahme der Verdopplung der Produkte in jedem Zyklus, was die Berechnung eines Faktors für die Expressionsunterschiede nach der sogenannten  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode erlaubt (Livak und Schmittgen, 2001). Jedoch zeigt sich im Verlauf der PCR eine Änderung der Amplifikationseffizienz (nachlassende Effizienz der

späteren Zyklen), da die Amplifikationsprodukte um eine DNA-Polymerase-Bindungsstelle konkurrieren (Kainz, 2000).

### **5.1.2 Eignung des ausgewählten Referenzgens**

Anstelle des deutschen Ausdrucks des Referenzgens, wird gerne der in der englischen Literatur genutzte Ausdruck des Housekeeping Gens verwendet. Sie gehören zu einer Gruppe von Genen, die ubiquitär vorkommen und für die Aufrechterhaltung verschiedener Zellfunktionen notwendig sind. Im Idealfall wird das Referenzgen konstant exprimiert und unterliegt keiner internen oder externen Regulation. Mit Hilfe dieser endogenen Kontrollgene können in Genexpressionsstudien relative Quantifizierungen von klinisch interessanten Zielgenen vorgenommen werden.  $\beta$ -Actin und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sind die zwei häufigsten verwendeten Referenzgene. Dies ist eher ihrer historischen Bedeutung, als der zuverlässigen Expression geschuldet (Gilliland et al., 1990). Das  $\beta$ -Actin ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts, das mit Aufgaben für die Zellbewegung behaftet ist. Es wird auf dem Gen-Locus 7p15-p12 lokalisiert (Blatti et al., 1988). Glare et al. konnte zeigen, dass die Transkriptionsrate durch mehrere Faktoren beeinflusst werden kann. Sowohl  $\beta$ -Actin-, als auch GAPDH-mRNA Level variieren mit der Zellproliferation. Die Level steigen als Antwort auf epidermale Wachstumsfaktoren und TGF- $\beta$  (Glare et al., 2002). Trotz kritischer Studienergebnisse werden  $\beta$ -Actin und GAPDH weiterhin als Referenzgene verwendet. Die Auswahl des Referenzgens, für die hier durchgeführte Untersuchung, orientiert sich an der in der Literatur allgemein üblichen Vorgehensweise.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

Betrachtet man die vorliegenden Daten und Angaben in der Eigenanamnese bestätigt sich, übereinstimmend mit anderen Studien, dass die Gruppe der AA niedrigere Gesamt-IgE-Spiegel und spezifische IgE-Spiegel im Serum gegenüber den gängigen inhalativen Aeroallergenen aufweisen als SA (Kerkhof et al., 2000). Obwohl es keinen absoluten IgE-Schwellenwert gibt, der das Vorliegen einer allergischen Erkrankung bestimmt, scheint ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Gesamt-IgE und dem Auftreten von Symptomen zu bestehen. Darüber hinaus scheinen die niedrigeren Gesamt-IgE-Spiegel der AA für eine erfolgreiche Regulation der Immunantwort auf Allergene in der Vergangenheit zu sprechen. Eine positive Familienanamnese ist nicht zwangsläufig mit der

Entwicklung einer allergischen Erkrankung verbunden, jedoch weisen ca. 64 % der untersuchten AA eine positive Familienanamnese auf. Dies ist ein weiterer Punkt, der für die Entwicklung eines Regulationsmechanismus gegen das Auftreten von spezifischen Symptomen spricht.

### **5.2.1 Immunmodulierendes Potential der TLR**

TLRs beeinflussen die Entwicklung des adaptiven Immunsystems vermutlich über die Aktivierung von antigen-präsentierenden Zellen. Die meisten Studien fokussieren sich hierbei auf die Signalkaskade, die die Th1-Immunantwort steuert, den Einsatz von Liganden als Adjuvants bei Impfungen oder die Prävention einer Th2 dominierten Immunantwort, wie sie bei Atopie beobachtet wird (Dabbagh und Lewis, 2003). Schmidt et al. konnte beispielsweise eine Abnahme der IgE-Produktion und einen Sekretionsanstieg der Th1-Zytokine (IL-2, IL-6, IL-12 und INF- $\gamma$ ) nach Stimulation von humanen PBMC mit synthetischen Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) nachweisen (Schmidt et al., 2006). Daher wäre anzunehmen, dass Patienten mit einer Th2-dominierten Erkrankung, wie Atopie, eine geringere TLR-Expression aufweisen. Für den TLR-2 kann dies in dieser Arbeit bestätigt werden. Während die Expressionslevel für TLR-2 auf mRNA-Ebene in Monozyten zwischen den Probandengruppen ähnlich hoch sind, fallen sie mit der Differenzierung zu DCs in der Gruppe der SA ab. Hingegen zeigt sich keine signifikante Herabregulation der mRNA Kopienzahl für TLR-2 und TLR-4 in der Gruppe der AA, was einen Kompensationsmechanismus mit Shift zu einer Th1-Antwort annehmen ließe. Auch in der Gruppe der Psoriasis Patienten, als Vertreter einer inflammatorischen Hauterkrankung mit Th1-Zell-Dominanz, lag das TLR-2 Expressionslevel auf DCs höher als in der Gruppe der SA und NA, was für die Aufrechterhaltung einer Th1-Antwort spricht. Der Verlauf einer atopischen Erkrankung scheint jedoch nicht nur durch eine reine Th2-Zell vermittelte Inflammationsreaktion charakterisiert zu sein. Vielmehr handelt es sich um eine komplexe Immunantwort, in die sowohl Th2-typische Zytokine wie IL-4 und IL-5 als auch Th1-typische Zytokine wie INF- $\gamma$  involviert sind (Akira et al., 2001). Dies konnte besonders bei der Chronifizierung von Erkrankungen gezeigt werden. In akuten Hautläsionen von atopischen Dermatitis Patienten lassen sich vermehrt Th2-Zellen und erhöhte Konzentrationen von IL-4, IL-5 und IL-13 nachweisen. Während in chronischen Läsionen das Auftreten von IFN- $\gamma$  produzierenden Th1-Zellen beobachtet wird. Dieser

Wandel ist auf den Einfluss von immigrierten eosinophilen Granulozyten, aktivierten Monozyten und IL-12 produzierenden DCs zurückzuführen (Bieber, 2010; Grewe et al., 1998). Über die Aktivierung von TLR-2 werden antigenpräsentierende Zellen dazu angeregt Zytokine wie IL-12 zu produzieren und eine Th1-Immunantwort zu induzieren (Akira et al., 2001). Die Monozyten des peripheren Blutes können wiederum unter dem Einfluss von INF- $\gamma$  die Expression von TLR-2 (und TLR-4) heraufregulieren (Mita et al., 2001) und somit zu einer Aufrechterhaltung des pro-inflammatorischen Milieus in Richtung einer Th1-Antwort führen.

## **5.2.2 TLR Expressionsmuster**

### **5.2.2.1 TLR-2 Expressionsrate und die Hygienehypothese**

Die Hygienehypothese wird gerne zur Erklärung für die gesteigerte Prävalenz von allergischen Erkrankungen herangezogen. In verschiedenen europäischen und nord-amerikanischen Studien wird angedeutet, dass die Exposition gegenüber mikrobiellen Produkten die kindliche Immunantwort gegen die Entwicklung einer allergischen Erkrankung stärkt (Garn und Renz, 2007) und die Einführung von Impfungen zu einem Anstieg des Erkrankungsrisikos bis in das Schulalter führt. Die Verordnung von Antibiotika wird ebenfalls als Risikofaktor für die Entwicklung von Asthma bei Kindern betrachtet, jedoch wird auch weiterhin in vielen Ländern ein kindliches Asthma mit Antibiotika behandelt, sodass die Korrelation falsch positiv sein könnte (Celedon et al., 2002).

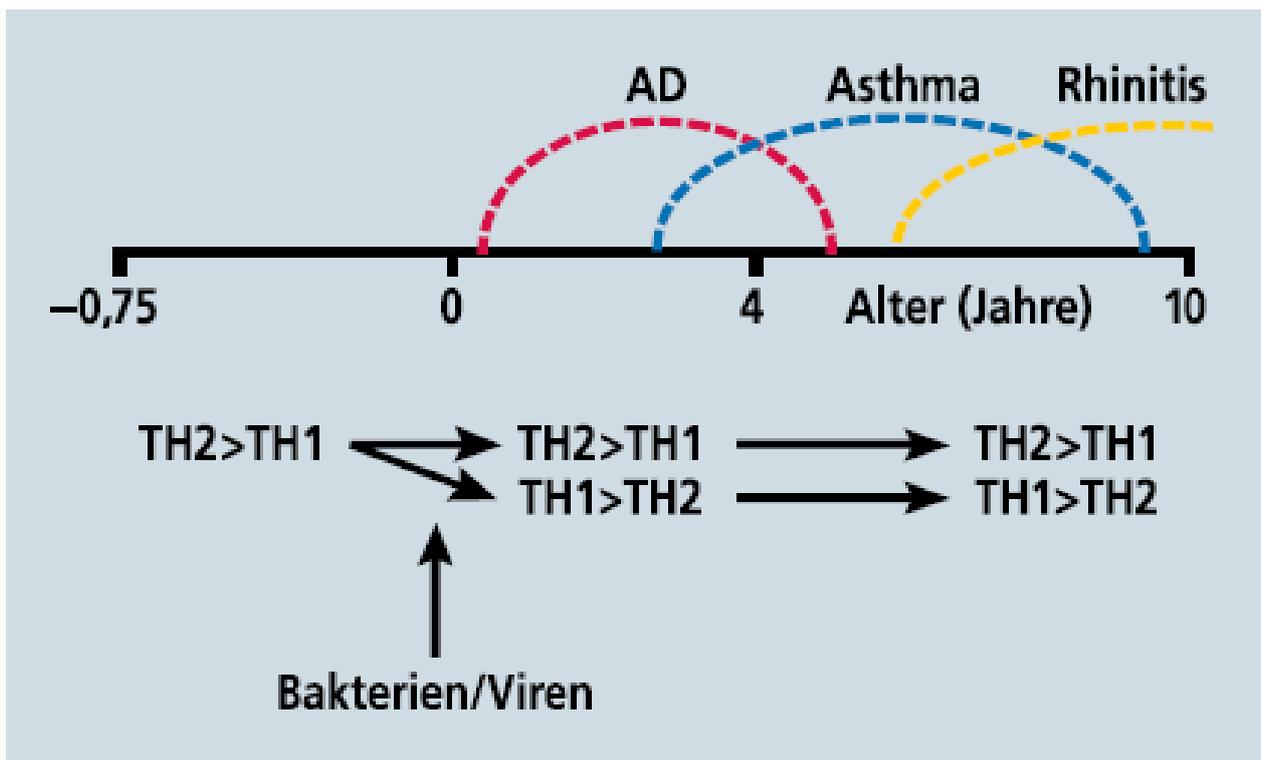
Die Erkennung von bakteriellen Endotoxinen wird hauptsächlich durch TLRs vermittelt. TLR-2 bindet Lipoteichonsäure, Peptidoglykane und Lipopolysaccharide, die Zellbestandteile gram-positiver Bakterien sind, denen Kinder während ihrer Entwicklung ausgesetzt sind (Durando et al., 2010). Wie die bakteriellen Endotoxine die Immunantwort beeinflussen, ist weiterhin von großem Forschungsinteresse. Es ist vorstellbar, dass die gesteigerte Bindung und Stimulation von PAMPs an TLR-2 in der Kindheit, zu einer erhöhten Rezeptorexpression in der Gruppe der asymptomatischen Atopiker und Nicht-Atopiker führen. Eine europäische Studie über Kinder, die auf einem Bauernhof aufgewachsen sind, konnte eine deutlich gesteigerte TLR-2-Expression in PBMC gegenüber einer Kontrollgruppe feststellen (Lauener et al., 2002a). Es ist davon auszugehen, dass die gesteigerte TLR-2-Expression bei Bauernkinder über die TLR-Signalkaskade vornehmlich zu einer Th1-Antwort führt und protektiv gegenüber der Entwicklung

einer Th2-dominierten atopischen Erkrankung wirkt. Die untersuchten Kinder könnten also ebenfalls in die Gruppe der asymptomatischen Atopiker fallen. Da zum Zeitpunkt der o.g. Studie diese Gruppe nicht untersucht wurde, ist an dieser Stelle nur Spekulation möglich. Auf Monozyten lässt sich in dieser Arbeit keine signifikante Steigerung der Expression zwischen den untersuchten Gruppen erheben. Die Probandengruppe der AA weist jedoch eine signifikant erhöhte Expression der TLR-2 mRNA in DCs gegenüber NA und SA auf. Das erwartete Ergebnis, dass die Gruppe der NA, ähnlich wie die Gruppe der AA, eine erhöhte mRNA-Expression aufweist und somit eine Erklärung für das nicht auftreten von Symptomen bietet, lässt sich nicht bestätigen. Dies lässt die Vermutung zu, dass nicht nur die Hygienehypothese eine wichtige Rolle spielt, sondern auch genetische Prädispositionen. Im Fall der Nicht-Atopiker fehlt eine genetische Disposition, denn nur 36 % der befragten Nicht-Atopiker bestätigte eine positive Familienanamnese für atopische Erkrankungen. Im Gegensatz zu den Atopikern, die zu 78,3 % eine positive Familienanamnese aufweisen, ist eine Regulation über TLRs nachrangig anzusehen. Die Psoriasis vulgaris, als Vertreter einer chronischen Hauterkrankung, ist durch eine überschießende Proliferation der Keratinozyten und eine bislang unerklärte Infiltration der befallenen Hautregionen durch T-Lymphozyten und Neutrophile-Granulozyten gekennzeichnet (Terhorst et al., 2010). Nicht überraschend ist die Erkenntnis, dass auch TLRs eine Rolle in der Pathogenese der Psoriasis spielen. Es gibt Studien, die belegen, dass die Expression von TLR-1 und TLR-2 in den Keratinozyten der akuten Hautläsionen erhöht ist. Dies lässt sich durch die gehäufte Co-Besiedelung der Hautbereiche mit *Staphylococcus aureus* erklären (Baker et al., 2003). Eine weitere Studiengruppe konnte eine erhöhte TLR-2 Expression auf DCs von Patienten mit einer psoriatischen Arthritis nachweisen, während sich bei den untersuchten Monozyten oder der TLR-4 Expression kein signifikanter Unterschied zu einer gesunden Kontrollgruppe nachweisen ließ (Candia et al., 2007). Diese Ergebnisse bestätigen sich auch in der vorliegenden Untersuchung, wo eine erhöhte TLR-2 Expression auf DCs in der Gruppe der Psoriasis Patienten auffällt, während sich kein signifikanter Unterschied in der TLR-4 und TLR-9 Expression oder auf Monozyten zeigt.

### 5.2.2.2 Zeitpunkt der Exposition und Stimulation von TLR

Schon die Studiengruppe um Strachan interessierte sich für das Auftreten von allergischen Symptomen zu unterschiedlichen Alterstufen in der kindlichen Entwicklung. Er nahm an, dass eine frühzeitige oder gar intrauterine Exposition bereits Auswirkungen auf die Entwicklung einer Atopie haben kann. Die Daten der Studiengruppe um Lauener zeigen, dass auch neben dem Zeitpunkt der Exposition die Höhe der mikrobiellen Belastung zu einer höheren TLR-2-Expression bei Kindern führen kann (Lauener et al., 2002b). Die Daten der hier vorliegenden Arbeit wurden an Erwachsenen erhoben und zeigen, dass in der Gruppe der AA bei 27 % der Untersuchten in der Kindheit Symptome einer Atopie auftraten, die im Erwachsenenalter nicht mehr bestehen. Diese drei Probanden werden nochmals genauer betrachtet und es zeigt sich, dass zwei der drei Probanden überdurchschnittlich hohe Messwerte aufweisen. So liegt der Mittelwert des Gesamt-IgE in der Gruppe der AA bei 121,32 kU/l, jedoch wurde bei den betrachteten Probanden Werte von 223 kU/l, bzw. 417 kU/l gemessen. Diese IgE Level sind somit teilweise höher als bei den symptomatischen Atopikern, wo der Mittelwert 173,74 kU/l beträgt. Es ist anzunehmen, dass in der Kindheit prädisponierende Faktoren vorlagen, die das Auftreten einer atopischen Erkrankung wahrscheinlich machten. Ergänzend zeigt sich bei diesen beiden Probanden ebenfalls überdurchschnittlich Höhe Kopienzahlen für TLR-2 und TLR-4 auf DCs. Dies verstärkt die Annahme, dass eine frühzeitige Stimulation durch bakterielle Pathogene die TLR-Expression steigert und protektiv gegenüber der Manifestation einer atopischen Erkrankung wirkt.

In der Kindheit und Jugend ist das Immunsystem in einer Entwicklungs- und Reifungsphase, wo es sehr empfänglich für äußere Einflüsse ist. Dies scheint der Zeitpunkt zu sein, wo der Kontakt mit der Umwelt die tiefgreifendsten Effekte aufweisen. Ebenfalls scheint bereits der pränatale Kontakt eine signifikante Rolle zu spielen. Sei es durch direkte Einwirkung in utero oder epigenetische Modulation (von Bubnoff, 2007).



**Abb. 14: Einfluss von Bakterien und Viren auf die Entwicklung einer Atopie**

Im Mutterleib dominieren während der Schwangerschaft und in der frühen Kindheit Immunantworten vom Th2-Typ. Durch die Reduktion des Th1-prägenden Einflusses, der durch bakterielle und virale Infektionen vermittelt wird, kommt es in der Kindheit zu einer Manifestation der Th2-Dominanz im Immunsystem dieser Kinder. Dies begünstigt das Fortschreiten atopischer Erkrankungen, die in bestimmten Lebensphasen als atopische Dermatitis, allergische Rhinitis und Asthma auftreten können. (Novak und Bieber, 2004)

### 5.2.2.3 Kinetik der TLR bei der Differenzierung zu DCs

Bei dem Vergleich der mRNA-Expression von TLR-2,-4, und-9 in Monozyten und DCs, konnte beobachtet werden, dass AA eine signifikant erhöhte Expression für TLR-2 in DCs gegenüber NA und SA besitzen. Entsprechend der bereits erwähnten Theorien, scheint ein frühzeitiger und anhaltender Stimulus mit Endotoxinen zu erhöhten TLR-Leveln bei der Prägung des Immunsystems zu führen. Während der Differenzierung von peripheren Monozyten zur DCs, zeigt sich bei fehlender Stimulation eine Abnahme der TLR-Expression, wobei diese in der Gruppe der AA keine signifikante Reduktion erfährt. Im Vergleich weisen SA, NA und P eine signifikante Reduktion der TLR-2 Expression bei der Differenzierung von Monozyten zu DCs auf. Die Signalqualität des Stimulus und der Signaltransduktion scheinen also eine funktionelle Bedeutung für die Entwicklung oder Vorbeugung einer allergischen Entzündungsreaktion zu haben. Dies konnte auch durch

andere Arbeitsgruppen bestätigt werden. Während die meisten *in vitro* und *in vivo* Versuche ein proinflammatorisches Signal nach Bindung von bakteriellem Lipoprotein (Pamp3Cys) oder Lipoteichonsäure an TLR-2 nachweisen (Redecke et al., 2004b), bestätigen Patel et al. die Manifestation einer allergischen Entzündungsreaktion der oberen Atemwege nach Bindung des TLR-2 Agonisten Pamp3CysK4 (Patel et al., 2005). Diese Beobachtung könnte durch eine dosisabhängige Immunantwort erklärbar zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass abhängig von der inhalierten LPS-Konzentration die Immunantwort in eine Th1- oder Th2- Antwort mündet. Die Inhalation hoher LPS-Mengen bewirkt die Induktion einer Th1-Antwort mit IL-12 Produktion. Dem gegenüber induziert die Inhalation niedriger LPS-Mengen keine Th1- aber eine Th2-Immunantwort (Eisenbarth et al., 2002). Darüberhinaus spielt auch MyD88 eine Rolle. So können MyD88-defizit Mäuse keine Aktivierung von antigenspezifischen Th1-Zellen hervorrufen, wohl aber eine Th2-Immunantwort. Dies lässt die Vermutung zu, dass die unterschiedlichen Signaltransduktionswege einen Einfluss auf den eingeschlagene Aktivierungsweg des adaptiven Immunsystem nehmen können (Schnare et al., 2001).

#### **5.2.2.4 Expressionsmuster des TLR-4**

Im Rahmen dieser Arbeit kann kein signifikanter Unterschied in den Expressionsprofilen für TLR-4 zwischen symptomatischen und asymptomatischen Atopikern und den Kontrollgruppen festgestellt werden. Sowohl in Monozyten als auch bei DCs weisen alle Gruppen auf mRNA-Ebene vergleichbare Expressionsmuster auf. Die Ergebnisse decken sich mit einer Studie, in der die Expression von TLR-4 in Mukosazellen der Nase bei Personen mit und ohne eine atopischen Erkrankung untersucht wurden. In dieser Studie konnten zwar Unterschiede in der Expression zwischen Kindern und Erwachsenen festgestellt werden, aber es waren keine signifikanten Unterschiede innerhalb der gleichen Altersgruppen nachweisbar (Tulic et al., 2004b). Auch bei anderen dermatologischen und systemischen Erkrankungen scheint die Expression von TLR-4 bezüglich der Quantität unbeeinflusst zu bleiben. Die TLR-4 Expression der Psoriasis Patienten ist in dieser Arbeit nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe verändert. Dabei steht bei der Psoriasis eine Th1-Zell dominierte Entzündungsreaktion mit gesteigerter Expression von INF- $\gamma$  und Suppression von IL-4 im Vordergrund. Demnach wäre eine Steigerung der TLR-4-Expression auf Monozyten zu erwarten gewesen. Möglicherweise spiegeln sich Unterschiede nicht in der

Quantität, sondern in einer veränderten Funktionalität wieder. Eine mögliche Ursache für eine gestörte Funktionalität von Rezeptor-vermittelten-Signaltransduktionswegen sind Mutationen einzelner Nukleotide, sogenannte *single nucleotide polymorphisms* (SNP). Polymorphismen in der extrazellulären Domäne des TLR-4, wie die Asp299Gly- und Thr399Ile-SNPs sind mit einer abgeschwächten Reaktion auf LPS assoziiert. Durch die gestörte Signalkaskade kommt es außerdem zu einer verminderten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Okayama et al., 2002). Auch die Arbeitsgruppe um Prefontaine konnte eine Beeinträchtigung des TLR-4 Signalweges in Monozyten bei Kindern mit einer atopischen Krankengeschichte nachweisen (Prefontaine et al., 2010).

#### **5.2.2.5 Expressionsmuster des TLR-9**

Toll-like-Rezeptoren scheinen, durch einen gezielten Kontakt mit bakteriellen Antigenen, in der Immunmodulation atopischer Erkrankungen eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Expression des TLR-9 lässt sich zu einem in Epithelzellen des oberen und unteren Atemwegssystems (Takeda et al., 2003; Platz et al., 2004), sowie in Monozyten, B-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und DCs (Saikh et al., 2004) nachweisen. B-Lymphozyten sind neben den Dendritischen Zellen, als stark TLR-9-exprimierende Zellpopulation beschrieben (Hornung et al., 2002b). Erstaunlich ist daher, dass in der vorliegenden Arbeit die Monozyten in allen untersuchten Probandengruppen stärker TLR-9 exprimieren als die untersuchten DCs. Ein Vergleich zu B-Lymphozyten wurde nicht erhoben. Die TLR-9 Expression zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit von der Lokalisation der Immunzellen. So ist die Expression im Knochenmark und in der Nasenschleimhaut höher als im peripheren Blut. Untersucht wurde lediglich die Expression von TLR-9 in Monozyten des peripheren Blutes, was die niedrigen Expressionslevel erklären könnte. Die erhöhten TLR-9 Level in der Nasenschleimhaut lassen sich zum einen durch eine favorisierte Rekrutierung von Neutrophilen mit hoher TLR-9 Expression oder durch eine Expressionssteigerung bei Migration in das Gewebe, erklären (Fransson et al., 2005). Im Gegensatz dazu lässt sich keine Veränderung der TLR-9 Expression nach dem Kontakt mit inhalativen Allergenen verzeichnen. Die generell erhöhte TLR-9 Expression im Nasenepithel und in den Lymphozyten der Nasenschleimhaut scheint also eher einer dauerhaften Exposition gegenüber bakteriellen und viralen Antigenen geschuldet zu sein (Fransson et al., 2007). Die spezifischen Liganden für TLR-9 sind unmethylierte

CpG-DNA (Bakterien, Mykobakterien) und ssDNA (Viren). So bindet CpG-DNA mit einer hohen Spezifität an den in DCs exprimierten TLR-9 und führt zu einer Aktivierung des intrazellulären Signaltransduktionswegs mit folgender Expression von IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10, IL-12 und Co-stimulatorischen Molekülen, wie CD 40 und B7. Dies kann die adaptive Immunantwort gegenüber Allergenen weg von einer pro-allergischen Th2-Immunantwort mit hohen IL-4 und IL-5 Leveln führen (Horner et al., 2004). Dieser Effekt wird in ersten Studien für die Optimierung der spezifischen Immuntherapie überprüft. So kann durch die Konjugation des Allergens mit CpG-DNA die Th2-Antwort und die saisonalen rhinokonjunktivalen Symptome reduziert werden (Tighe et al., 2000). Seit Jahren wird an der Weiterentwicklung von sicheren und effizienten Adjuvantien für die Immuntherapie gearbeitet (Aryan et al., 2013). Eine vielversprechende Möglichkeit scheint die Verwendung von TLR-Agonisten als Adjuvanz zu sein (Aryan et al., 2014). Die 1018 immunstimulatorische Sequenz (ISS) ist ein synthetisches Oligonucleotid mit CpG-Motiven, das die TLR-9 Kaskade aktiviert. In den Studien von Tulic et al. (Tulic et al., 2004a) und Creticos et al. (Creticos et al., 2006) konnte gezeigt werden, dass 1018 ISS gemeinsam mit einem Gräserpollenallergen (Amb a1) die Immunantwort in Richtung einer Th1- und Treg-Antwort verschiebt. Darüber hinaus wird die Antikörperproduktion von IgE in Richtung blockierender IgG-Antikörper verändert (Tulic et al., 2004a).

### **5.2.3 Korrelation von spezifischem IgE und TLR-2 Expression**

Die TLR-2 Expression in Monozyten korreliert nicht mit dem Gesamt-IgE-Level der vier Probandengruppen. Eine Korrelation der TLR-2 Expression in DCs mit dem Gesamt-IgE Level konnte lediglich für die Probandengruppe der SA nachgewiesen werden. So weisen sowohl SA als auch AA erhöhte Gesamt-IgE-Level auf, wohingegen die TLR-2 Expression bei der Differenzierung von Monozyten zu DCs in der Gruppe der SA signifikant herabreguliert wird, während die TLR-2 Expression in DCs in der Gruppe der AA keine signifikante Regulation erfährt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Unterschiede in der TLR-2 Regulation für den Unterschied der Atopie-Manifestation verantwortlich sein können, sodass zwischen symptomatischen und asymptomatischen Atopikern unterschieden werden kann.

Schmidt et al. konnte beispielsweise eine Abnahme der IgE-Produktion und einen Sekretionsanstieg der Th1-Zytokine (IL-2 und INF- $\gamma$ ) nach Stimulation von humanen

PBMC mit synthetischen Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) nachweisen (Schmidt et al., 2006). Unter der Annahme, dass AA eine höhere Expression von TLR-2 auf DCs ausweist, kommt es über eine erhöhte TLR-Stimulation zu erhöhten Th1-Zytokin-Leveln und somit einer geringeren IgE-Produktion, die eine Manifestation von atopiespezifischen Symptomen hervorrufen würde. Die Gesamt-IgE-Level der AA sind zwar nicht signifikant niedriger als in der Gruppe der SA, aber könnten durch veränderte Bindungseigenschaften an den IgE-Rezeptor zu einer veränderten klinischen Ausprägung der Atopie führen.

Ein wichtiger Rezeptor für die Manifestation einer symptomatischen Atopie ist der Fc $\epsilon$ RI, ein hochaffiner IgE-Rezeptor, der in die Antigenerkennung involviert ist. Dieser Transmembranrezeptor besitzt die Fähigkeit IgE-Antikörper unterschiedlicher Spezifität zu binden und über eine Quervernetzung mit bestimmten Allergenen einen intrazellulären Signalweg, ähnlich den TLRs, mit Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen zu starten (Blank und Rivera, 2004). Die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ RI wurde auf Dendritischen Zellen der Haut, den epidermalen Langerhans Zellen (Bieber et al., 1992) auf dermalen Dendritischen Zellen (Osterhoff et al., 1994) und auf im peripheren Blut zirkulierenden Dendritischen Zellen nachgewiesen (Maurer et al., 1996). Es scheint, dass besonders Fc $\epsilon$ RI exprimierende DCs in der Lage sind, die spezifische IgE-Synthese und Aktivierung von Th2-Zellen zu steuern (Bieber, 1997). Eine Interaktion von TLR und Fc $\epsilon$ RI bei der Regulation der IgE-Synthese von B-Zellen ist möglich und könnte zu einem veränderten Aktivierungsmuster und Zytokinmilieu der Effektorzellen führen (Novak et al., 2010). Ein weiterer wichtiger gemeinsamer Angriffspunkt scheinen Mastzellen zu sein. Über eine IgE-Bindung am Fc $\epsilon$ RI wird die Synthese und Freisetzung von Histamin gesteuert. Darüber hinaus konnte von McCurdy et al. gezeigt werden, dass Mastzellen auch TLR-2 exprimieren (McCurdy et al., 2003). Lipoteichonsäure, als Ligand des TLR-2/TLR-6-Komplex, führt dosisabhängig zu der Herabregulation von Fc $\epsilon$ RI-Expression auf Mastzellen und verhindert eine Degranulation. So scheinen TLR-2 Liganden einen protektiven Effekt gegenüber der Aktivierung und Degranulation von Mastzellen zu erwirken (Yoshioka et al., 2007). In dieser Arbeit wurde jedoch die TLR-2 Expression auf Mastzellen nicht untersucht.

## 6. Zusammenfassung

Atopie ist durch eine überhöhte IgE-Antikörperproduktion nach dem Kontakt mit einem Umweltallergen charakterisiert. Darüber hinaus existiert eine genetische Prädisposition in Atopiker-Familien eine atopische Erkrankung, wie Rhinokonjunktivitis, *Asthma bronchiale* oder ein atopisches Ekzem, zu entwickeln (Bieber, 1997). Es kommt also auf eine Interaktion zwischen genetischer Disposition und Umwelteinflüssen an, die zur Ausprägung einer symptomatischen Atopie führt. Dendritische Zellen sitzen an den Eintrittspforten für Umwelteinflüsse und spielen über ihre Expression von Toll-like-Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern. Sie stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort dar. Das immunmodulatorische Potential von TLRs kann durch die Produktion von Zytokinen die Immunantwort lenken und Erkrankungen, die durch eine Th1/Th2-Dysbalance gekennzeichnet sind, beeinflussen. Sie haben somit eine Schlüsselstellung im Voranschreiten einer atopischen Disposition zu einem atopischen Krankheitsbild. Die Hygienehypothese bestärkt die Annahme, dass die gesteigerte Bindung und Stimulation von PAMPs an TLR-2 in der Kindheit, zu einer erhöhten Rezeptorexpression führen. Eine erhöhte Rezeptorexpression lässt sich auch in dieser Arbeit für den TLR-2 auf Dendritischen Zellen nachweisen. Hier weisen asymptomatische Atopiker und Psoriasis Patienten signifikant höhere Expressionslevel als symptomatische Atopiker auf. Eine europäische Studie über Kinder, die auf einem Bauernhof aufgewachsen sind, konnte ebenfalls eine deutlich gesteigerte TLR-2-Expression in PBMCs gegenüber einer Kontrollgruppe feststellen (Lauener et al., 2002a). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die steigende Prävalenz atopischer Erkrankungen durch verbesserte hygienische Bedingungen, medizinische Versorgung und eine damit verbundene Abnahme der mikrobiellen Stimulation im Kindesalter bedingt sein können (Strachan, 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der immunmodulatorische Einfluss der TLR-4 und TLR-9 auf die Entwicklung einer atopischen Erkrankung, sich nicht ausschließlich auf quantitative Unterschiede zwischen den Probandengruppen beschränkt. Die Daten lassen Spielraum, dass darüber hinaus Signalmodifikationen, Polymorphismen und Interaktionen mit anderen Oberflächenmolekülen eine wichtige Rolle spielen. Eine intensive Interaktion zwischen den TLRs und weiteren Oberflächenrezeptoren ist eine

bemerkenswerte Eigenschaft der TLRs (Krieg, 2006) und es lassen sich mehrere Kreuzungspunkte der intrazellulären Signaltransduktionswege von Fc $\epsilon$ RI und TLRs, wie den NF- $\kappa$ B-Signalweg, nachweisen (Kraft und Kinet, 2007). Ein weiterer Untersuchungsansatz zum Verständnis und Entwicklung von therapeutischen Konsequenzen könnte bei den Fc $\epsilon$ RI-exprimierenden, antigenpräsentierenden Zellen liegen. Ihnen kommt eine wichtige Bedeutung bei der IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ im Rahmen von atopischen Krankheiten zu (Kraft et al., 2002) (Novak und Bieber, 2005). Es kann bestätigt werden, dass die Fc $\epsilon$ RI-Expression auf APCs durch das Umfeld der Zelle verändert werden kann (Wollenberg et al., 1995). Warum also nicht durch Interaktion mit den TLRs?

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Zunahme allergischer Erkrankungen eine evidenzbasierte Prävention notwendig macht. Die gegenwärtigen Therapiestrategien fokussieren sich auf die Allergenkarenz als Primärprävention und die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) als Sekundärprävention. Auslöser einer allergischen Reaktion der oberen Atemwege, wie Umwelt-Allergene und Luftverschmutzung wirken modulatorisch auf die Expression und Funktion von TLR. Insbesondere Gräserpollen (Rachmilewitz et al., 2004) und Hausstaubmilben (Ryu et al., 2013) teilen ähnliche Strukturelemente mit Endotoxinen und single-stranded RNAs, die eine Entzündungsreaktion der Atemwege über TLR-4 und TLR-9 auslösen (Golebski et al., 2014). Daher kann die Anwendung von TLR Agonisten für die Immuntherapie synergistische Effekte erzielen (Gauvreau et al., 2006). In der Folge sind die wissenschaftlichen Bestrebungen einen therapeutischen Nutzen aus einer gezielten Exposition, gegenüber definierten bakteriellen oder viralen Antigenen zu ziehen, hoch.

## 7. Anhang, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 7.1 Anhang

# Fragebogen zur Studie: Expressionsmuster von Toll-like-Rezeptoren bei Atopikern

Exp. Nummer:.....

Männlich

Alter: .....

Weiblich

ausgefüllt am: \_\_\_\_\_

## A. EIGENANAMNESE

- 1) Leiden Sie an:
- |   |                          |
|---|--------------------------|
| allergischem Asthma bronchiale              | <input type="checkbox"/> |
| Atopische Rhinitis (allergischer Schnupfen) | <input type="checkbox"/> |
| Atopische Dermatitis (Neurodermitis)        | <input type="checkbox"/> |
| Psoriasis (Schuppenflechte)                 | <input type="checkbox"/> |
| Nichts der oben genannten                   | <input type="checkbox"/> |

- 2) In welchem Alter sind die ersten Beschwerden aufgetreten?

mit ..... Jahren

- 3) Wie stark würden Sie persönlich Ihre Beschwerden auf einer Skala von 1-10 (1= sehr schwach, 10= sehr stark) bewerten?

1    2    3    4    5    6    7    8    9    10

- 4) Wann treten die Hauptbeschwerden auf?

- Dauerbeschwerden im ganzen Jahr
- unregelmäßige Abstände über das ganze Jahr verteilt
- im phasenartigen Verlauf
- während des ganzen Jahres, aber in best. Monaten schlimmer
- ausschließlich im \_\_\_\_\_ (Monat/e)

- 5) Treten die Beschwerden zu bestimmten Tageszeiten auf

- nein
- ja, zu folgenden Tageszeiten: \_\_\_\_\_

## 6) Treten die Beschwerden an bestimmten Orten auf?

- ortsunabhängig
- in der Wohnung
- am Arbeitsplatz
- bei Tierkontakt, bei folgenden Tieren: \_\_\_\_\_
- im Freien
- bei körperliche Anstrengung

## 7) Besteht zeitweilig eine völlige Beschwerdefreiheit?

- nein, es besteht nie eine Beschwerdefreiheit
- ja,
  - im Urlaub
  - bei Regen
  - im Sommer
  - im Winter
  - sonstige: \_\_\_\_\_

## 8) Bekannte Allergieauslöser:

---



---

## 9) Ist bereits ein Allergietest durchgeführt worden?

- nein
- ja, im Jahr .....
- ja, aber bei der Testung fanden sich keine Hinweise auf eine Allergie

## 10) Bestehen oder bestanden früher folgende Krankheitserscheinungen?

- |  | Monat       | Jahr  | Jahr       |
|--|-------------|-------|------------|
| <input type="checkbox"/> Bronchitis als Kind         | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Krupphusten                 | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Säuglingsekzem, Milchschorf | seit: _____ | _____ | bis: _____ |

Lokalisation: \_\_\_\_\_

- |  |             |       |            |
|--|-------------|-------|------------|
| <input type="checkbox"/> allergisches Asthma | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
|--|-------------|-------|------------|

Anfallshäufigkeit: \_\_\_\_\_mal/Jahr

- |   |             |       |            |
|---|-------------|-------|------------|
| <input type="checkbox"/> Reizhusten                                     | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Heuschnupfen                                   | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Niesanfalle (mehr als 5x nacheinander)         | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Nasenpolypen                                   | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Augen tränen, Augen jucken, geschwollene Lider | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Hautquaddeln, Nesselsucht                      | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Ekzem, Neurodermitis                           | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Psoriasis (Schuppenflechte)                    | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Migräne  | seit: _____ | _____ | bis: _____ |
| <input type="checkbox"/> Häufige fieberhafte Erkältungskrankheiten      | seit: _____ | _____ | bis: _____ |

11) Ist eine Hyposensibilisierung durchgeführt worden?

- nein  
 ja, seit: \_\_\_\_\_ bis: \_\_\_\_\_  
 mit gutem Erfolg  
 ohne wesentlichen Erfolg  
 abgebrochen ( warum?: \_\_\_\_\_ )

12) Welche Behandlungsverfahren sind sonst durchgeführt worden?

- Akupunktur  
 Atemtherapie  
 Autogenes Training  
 sonstige: \_\_\_\_\_

13) Sind bereits Operationen wegen der Erkrankung durchgeführt worden?

- nein  
 ja,  Nasenpolypen  
 Rachenmandeln (Adenotomie)  
 Gaumenmandeln ( Tonsillektomie)  
 Nasenscheidewand  
 sonstige: \_\_\_\_\_

14) Welche Expositionsstellen zeigen sich bei Neurodermitis oder Psoriasis (Schuppenflechte) ?

- Arme  
 Beine  
 Kopf  
 Stamm (Rücken)  
 sonstige: \_\_\_\_\_

15) Existieren bestimmte Provokationsfaktoren für Psoriasis (Schuppenflechte)?

- Druck  Stress  
 Hitze  Genussmittel  
 chem. Substanzen  Infekte  
 sonstige: \_\_\_\_\_

16) Beschreibung der Psoriasis-/ Neurodermitis- Herde!

- Größe: \_\_\_\_\_ cm  
 Form:  örtlich begrenzt  
 flächig  
 mehrere verteilte Herde  
 Schuppung:  ja  
 nein  
 Rötung  ja  
 nein  
 PASI-Index \_\_\_\_\_

17) Welche Medikamente und Salben verwenden Sie regelmäßig?

---



---

18) Welche weiteren bekannten Erkrankungen bestehen bei Ihnen?

---



---

## **2. FAMILIENANAMNESE**

1) Leidet oder litt einer Ihrer nahen Verwandten an Atem- oder Hautbeschwerden?

nein, nicht bekannt

ja, ich weiß von:

	allerg.Asthma	Heuschnupfen	Neurodermitis	Psoriasis
Vater	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mutter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bruder	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schwester	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tochter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sohn	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Ich erkläre meine persönlichen Daten hiermit zu Studienzwecken freigegeben.

---

Datum, Unterschrift

## 7.2 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Toll-like-Rezeptoren und ausgewählte Liganden nach (Akira et al., 2006) .....	17
Tab. 2: Probandenauswertung .....	36
Tab. 3: Kultivierung von DCs aus Monozyten .....	38
Tab. 4: Forward und reverse Primer der Real-time PCR .....	41
Tab. 5: Probandenauswertung .....	43
Tab. 6: Expositionslokalisation in % .....	47
Tab. 7: Probandenübersicht Gesamt-IgE im Serum in kU/l.....	48
Tab. 8: Mittelwerte des Spezifischen IgE Level (kU/l). .....	50
Tab. 9: mRNA Kopienzahlen von TLR-2 und seinem Referenzgen $\beta$ -Actin in Monozyten .....	54
Tab. 10: Korrelation zwischen Gesamt-IgE (in kU/l) und der TLR-2 Expression in Dendritischen Zellen (DC) bei symptomatischen Atopikern. ....	65

## 7.3 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen (Markert, 2006). .....	13
Abb. 2: Th1 und Th2 Immunantwort nach Mosmann 1989 (Markert, 2006). .....	16
Abb. 3: Signalkaskade der Toll-like-Rezeptoren nach (Xiang et al., 2010).. .....	20
Abb. 4: Häufigkeitsverteilung des subjektiven Beschwerdegrades .....	45
Abb. 5: Häufigkeitsverteilung des Auftretens der Hauptbeschwerden.....	46
Abb. 6: Graphische Darstellung der Mittelwerte des gesamt Serum IgE in kU/l.....	49
Abb. 7: Auswertung anhand einer exemplarischen fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse der isolierten Monozyten .....	52
Abb. 8: Auswertung anhand einer exemplarischen fluorescence-activated cell sorting (FACS)-Analyse der kultivierten DCs .....	53
Abb. 9: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-2 in Monozyten und DCs normalisiert auf das Referenzgen $\beta$ -Actin.. .....	55
Abb. 10: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-4 in Monozyten und DCs normalisiert auf das Referenzgen $\beta$ -Actin. ....	57

Abb. 11: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-9 in Monozyten und DCs normalisiert auf das Referenzgen $\beta$ -Actin. ....	60
Abb. 12: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-2 in Monozyten und DCs.....	62
Abb. 13: Diagramm zum Vergleich der mRNA Expression von TLR-4 in Monozyten und DCs normalisiert auf das Referenzgen $\beta$ -Actin.. ....	63
Abb. 14: Einfluss von Bakterien und Viren auf die Entwicklung einer Atopie .....	73

## 8. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-793

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-680

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738

Allen MH, Ameen H, Veal C, Evans J, Ramrakha-Jones VS, Marsland AM, Burden AD, Griffiths CE, Trembath RC, Barker JN. The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 103-106

Anderson GP, Coyle AJ. TH2 and 'TH2-like' cells in allergy and asthma: pharmacological perspectives. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 324-332

Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-19

Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985; 42: 791-798

Angkasekwinai P, Park H, Wang YH, Wang YH, Chang SH, Corry DB, Liu YJ, Zhu Z, Dong C. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med* 2007; 204: 1509-1517

Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, Uppington KM, Millar AB. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 312-319

Aryan Z, Compalati E, Canonica GW, Rezaei N. Allergen-specific immunotherapy in asthmatic children: from the basis to clinical applications. *Expert Rev Vaccines* 2013; 12: 639-659

Aryan Z, Holgate ST, Radzioch D, Rezaei N. A new era of targeting the ancient gatekeepers of the immune system: toll-like agonists in the treatment of allergic rhinitis and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2014; 164: 46-63

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-920

- Baena-Cagnani CE. The global burden of asthma and allergic diseases: the challenge for the new century. *Curr Allergy Asthma Rep* 2001; 1: 297-298
- Baker BS, Ovigne JM, Powles AV, Corcoran S, Fry L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 2003; 148: 670-679
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
- Begon E, Michel L, Flageul B, Beaudoin I, Jean-Louis F, Bachelez H, Dubertret L, Musette P. Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol* 2007; 17: 497-506
- Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996; 196: 121-135
- Bieber T. Fc epsilon RI-expressing antigen-presenting cells: new players in the atopic game. *Immunol Today* 1997; 18: 311-313
- Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 2010; 22: 125-137
- Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, de la Salle C. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med* 1992; 175: 1285-1290
- Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol* 2004; 25: 266-273
- Blatti SP, Foster DN, Ranganathan G, Moses HL, Getz MJ. Induction of fibronectin gene transcription and mRNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 1119-1123
- Bode C, Diedrich B, Muenster S, Hentschel V, Weisheit C, Rommelsheim K, Hoelt A, Meyer R, Boehm O, Knuefermann P, Baumgarten G. Antibiotics regulate the immune response in both presence and absence of lipopolysaccharide through modulation of Toll-like receptors, cytokine production and phagocytosis in vitro. *Int Immunopharmacol* 2014; 18: 27-34
- Boom WH, Liano D, Abbas AK. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. II. Effects of interleukin 4- and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. *J Exp Med* 1988; 167: 1350-1363
- Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 508-514

Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von ME. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347: 869-877

Broide DH. Immunomodulation of allergic disease. *Annu Rev Med* 2009; 60: 279-291

Calderon MA, Gerth van WR, Eichler I, Matricardi PM, Varga EM, Kopp MV, Eng P, Niggemann B, Nieto A, Valovirta E, Eigenmann PA, Pajno G, Bufe A, Halken S, Beyer K, Wahn U. Perspectives on allergen-specific immunotherapy in childhood: an EAACI position statement. *Pediatr Allergy Immunol* 2012; 23: 300-306

Candia L, Marquez J, Hernandez C, Zea AH, Espinoza LR. Toll-like receptor-2 expression is upregulated in antigen-presenting cells from patients with psoriatic arthritis: a pathogenic role for innate immunity? *J Rheumatol* 2007; 34: 374-379

Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, Leong DU, Panko JM, McAllister LB, Hansen CB, Papenfuss J, Prescott SM, White TJ, Leppert MF, Krueger GG, Begovich AB. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 273-290

Celedon JC, Litonjua AA, Ryan L, Weiss ST, Gold DR. Lack of association between antibiotic use in the first year of life and asthma, allergic rhinitis, or eczema at age 5 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 72-75

Chodiseti SB, Gowthaman U, Rai PK, Vidyarthi A, Khan N, Agrewala JN. Triggering through TLR-2 limits chronically stimulated Th1 cells from undergoing exhaustion. *J Infect Dis* 2014;

Chomczynski P, Sacchin N. Single-step Method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162 (1): 156-159

Clark GJ, Angel N, Kato M, Lopez JA, MacDonald K, Vuckovic S, Hart DN. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes Infect* 2000; 2: 257-272

Clemens von Pirquet. *Allergie. Münchener Medizinische Wochenschrift* 1906;1457.

Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* 1997; 186: 1737-1747

Corinti S, Albanesi C, la SA, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 2001; 166: 4312-4318

Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; 402: B18-B23

Crawford K, Gabuzda D, Pantazopoulos V, Xu J, Clement C, Reinherz E, Alper CA. Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells. *J Immunol* 1999; 163: 5920-5928

Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, Li H, Coffman R, Seyfert V, Eiden JJ, Broide D. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 1445-1455

Dabbagh K, Lewis DB. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 199-204

Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Irfng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 145-153

Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R, Cheng G. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002; 17: 251-263

Durando P, Bassetti M, Orenco G, Crimi P, Battistini A, Tiberio G, Bellina D, Talamini A, Dodi F, Ansaldi F, Alicino C, Iudici R, Sticchi L, De FD, Viscoli C, Icardi G. Hospital-acquired infections and leading pathogens detected in a regional university adult acute-care hospital in Genoa, Liguria, Italy: results from a prevalence study. *J Prev Med Hyg* 2010; 51: 80-86

Ebner S, Hofer S, Nguyen VA, Furhapter C, Herold M, Fritsch P, Heufler C, Romani N. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol* 2002; 168: 6199-6207

Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002; 196: 1645-1651

Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996; 183: 195-201

Fransson M, Adner M, Erjefalt J, Jansson L, Uddman R, Cardell LO. Up-regulation of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in allergic rhinitis. *Respir Res* 2005; 6: 100

Fransson M, Benson M, Erjefalt JS, Jansson L, Uddman R, Bjornsson S, Cardell LO, Adner M. Expression of Toll-like receptor 9 in nose, peripheral blood and bone marrow during symptomatic allergic rhinitis. *Respir Res* 2007; 8: 17

Fritsch P. *Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas.* Heidelberg: Springer Verlag, 2003

Garn H, Renz H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology* 2007; 212: 441-452

Gauvreau GM, Hessel EM, Boulet LP, Coffman RL, O'Byrne PM. Immunostimulatory sequences regulate interferon-inducible genes but not allergic airway responses. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 15-20

- Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 2725-2729
- Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 2002; 57: 765-770
- Golebski K, Luiten S, Van ED, de GE, Roschmann KI, Fokkens WJ, van Drunen CM. High degree of overlap between responses to a virus and to the house dust mite allergen in airway epithelial cells. *PLoS One* 2014; 9: e87768
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953-964
- Grevers G, Röcken M. *Taschenatlas Allergologie: Grundlagen, Diagnostik, Klinik*. Stuttgart: Thieme Verlag, 2008
- Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 1998; 19: 359-361
- Gupta GK, Agrawal DK. CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic application in allergy and asthma. *BioDrugs* 2010; 24: 225-235
- Hammad H, Charbonnier AS, Duez C, Jacquet A, Stewart GA, Tonnel AB, Pestel J. Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 2001; 98: 1135-1141
- Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 2009; 15: 410-416
- Hashimoto S, Yamada M, Motoyoshi K, Akagawa KS. Enhancement of macrophage colony-stimulating factor-induced growth and differentiation of human monocytes by interleukin-10. *Blood* 1997; 89: 315-321
- Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 271-283
- Heine H, Lien E. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 180-192
- Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402: B2-B4
- Horner AA, Redecke V, Raz E. Toll-like receptor ligands: hygiene, atopy and therapeutic implications. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 555-561
- Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2: 835-841

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168: 4531-4537

Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Host A, Koivikko A, Norberg LA, Valovirta E, Wahn U, Moller C. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 2007; 62: 943-948

Janeway Jr. CA PTMW. *Immunobiology*. New York: Garland Publishing, 2001

Janeway Jr. CA PTMW. *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002

Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1494: 23-27

Kamer B, Pasowska R, Dolka E, Blomberg A, Rotsztejn H. Prevalence of atopic dermatitis in infants during the first six months of life: authors' observations. *Postepy Dermatol Alergol* 2013; 30: 277-281

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11: 115-122

Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009; 21: 317-337

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167: 5887-5894

Kerkhof M, Schouten JP, De Monchy JG. The association of sensitization to inhalant allergens with allergy symptoms: the influence of bronchial hyperresponsiveness and blood eosinophil count. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1387-1394

Kolb-Mäurer A. *Aktuelle Dermatologie* 2004; 30 - V10 DOI: 10.1055/s-2004-835980

Kraft S, Kinet JP. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 365-378

Kraft S, Novak N, Katoh N, Bieber T, Rupec RA. Aggregation of the high-affinity IgE receptor Fc(ε)RI on human monocytes and dendritic cells induces NF-κB activation. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 830-837

Kragballe K, Austad J, Barnes L, Bibby A, de la Brassinne M, Cambazard F, Fleming C, Heikkila H, Williams Z, Peyri RJ, Svensson A, Toole J, Wozel G. Efficacy results of a 52-week, randomised, double-blind, safety study of a calcipotriol/betamethasone dipropionate two-compound product (Daivobet/Dovobet/Taclonex) in the treatment of psoriasis vulgaris. *Dermatology* 2006; 213: 319-326

Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 471-484

Lambrecht BN, Hammad H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* 2012a; 30: 243-270

Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 2012b; 18: 684-692

Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufe A, Herz U, von ME, Nowak D, Riedler J, Waser M, Sennhauser FH. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 2002; 360: 465-466

Legge KL, Gregg RK, Maldonado-Lopez R, Li L, Caprio JC, Moser M, Zaghoulani H. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med* 2002; 196: 217-227

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983

Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 860-876

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4: 357-362

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 2001; 25: 402-408

Löffler, Petrides. *Biochemie&Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer Verlag, 2003

Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999; 13: 1015-1024

Lou H, Fu Y, Wang C, Wang Y, Zhang L. [Imbalance between Th1 and Th2 cells in cord blood is influenced by maternal allergic rhinitis and associated with atopic dermatitis during the first two years of life]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2014; 49: 390-394

Ludwig RJ, Herzog C, Rostock A, Ochsendorf FR, Zollner TM, Thaci D, Kaufmann R, Vogl TJ, Boehncke WH. Psoriasis: a possible risk factor for development of coronary artery calcification. *Br J Dermatol* 2007; 156: 271-276

Majak P, Brzozowska A, Bobrowska-Korzeniowska M, Stelmach I. Early exposure to unhygienic conditions and infections is associated with expression of different Toll-like receptors. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19: 260-265

Maldonado-Lopez R, De ST, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 1999; 189: 587-592

Markert A. Charakterisierung von Monozyten anhand ihrer Interleukin-10-Produktion und Darstellung der Existenz funktionell unterschiedlicher Subpopulationen (M1/M2) analog den Th1/Th2-Schema 2006.

Matsuguchi T, Musikachoen T, Ogawa T, Yoshikai Y. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 2000; 165: 5767-5772

Maurer D, Fiebiger S, Ebner C, Reininger B, Fischer GF, Wichlas S, Jouvin MH, Schmitt-Egenolf M, Kraft D, Kinet JP, Stingl G. Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol* 1996; 157: 607-616

McCurdy JD, Olynych TJ, Maher LH, Marshall JS. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol* 2003; 170: 1625-1629

Mita Y, Dobashi K, Endou K, Kawata T, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4. *Immunol Lett* 2002; 81: 71-75

Mita Y, Dobashi K, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. Toll-like receptor 2 and 4 surface expressions on human monocytes are modulated by interferon-gamma and macrophage colony-stimulating factor. *Immunol Lett* 2001; 78: 97-101

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173

Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 1991; 12: A49-A53

Mrowietz U, Reich K. Psoriasis--new insights into pathogenesis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 11-8, quiz

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002; 3: 667-672

Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319-326

Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573

Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1953; 4: 285-288

Novak N, Bieber T. Pathophysiologie der atopischen Dermatitis. *Dtsch Arztebl Int* 2004; 101: A108-A120

Novak N, Bieber T. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: S171-S176

Novak N, Bieber T, Katoh N. Engagement of Fc epsilon RI on human monocytes induces the production of IL-10 and prevents their differentiation in dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167: 797-804

Novak N, Bieber T, Peng WM. The immunoglobulin E-Toll-like receptor network. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151: 1-7

Okayama N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Fujiwara M, Matsubara T, Maekawa T, Hazama S, Oka M, Nohara H, Kayano K, Okita K, Hinoda Y. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the Toll-like receptor-4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 56-58

Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschueren IC, Arts P, Garritsen A, van EH, Sturm P, Kullberg BJ, Hoischen A, Adema GJ, van der Meer JW, Netea MG, Joosten LA. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E4478-E4484

Osterhoff B, Rappersberger K, Wang B, Koszik F, Ochiai K, Kinet JP, Stingl G. Immunomorphologic characterization of Fc epsilon RI-bearing cells within the human dermis. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 315-320

Ozdemir C, Akdis M, Akdis CA. T-cell response to allergens. *Chem Immunol Allergy* 2010; 95: 22-44

Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74: 2527-2534

Patel M, Xu D, Kewin P, Choo-Kang B, McSharry C, Thomson NC, Liew FY. TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 174: 7558-7563

Pawankar R, Mori S, Ozu C, Kimura S. Overview on the pathomechanisms of allergic rhinitis. *Asia Pac Allergy* 2011; 1: 157-167

Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e73

Pfaar O, Bachert C, Bufe A, Buhl R, Ebner C, Eng P, Friedrichs F, Fuchs T, Hamelmann E, Hartwig-Bade D, Hering T, Huttegger I, Jung K, Klimek L, Kopp MV, Merk H, Rabe U, Saloga J, Schmid-Grendelmeier P, Schuster A, Schwerk N, Sitter H, Umpfenbach U, Wedi B, Wohrl S, Worm M, Kleine-Tebbe J, Kaul S, Schwalfenberg A. Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases: S2k Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (OGAI), the Swiss Society for

Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto- Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGHNO-KHC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Pneumology (GPP), the German Respiratory Society (DGP), the German Association of ENT Surgeons (BV-HNO), the Professional Federation of Paediatricians and Youth Doctors (BVKJ), the Federal Association of Pulmonologists (BDP) and the German Dermatologists Association (BVDD). *Allergo J Int* 2014; 23: 282-319

Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 2004; 173: 1219-1223

Prefontaine D, Banville-Langelier AA, Fiset PO, Guay J, An J, Mazer M, Hamid Q, Mazer BD. Children with atopic histories exhibit impaired lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor-4 signalling in peripheral monocytes. *Clin Exp Allergy* 2010; 40: 1648-1657

Prescott SL, Bjorksten B. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 255-262

Quinn JM, Gillespie MT. Modulation of osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 739-745

Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 520-528

Randolph DA, Stephens R, Carruthers CJ, Chaplin DD. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 104: 1021-1029

Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* 2002; 196: 517-527

Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1047-1054

Redecke V, Hacker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, Raz E. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004; 172: 2739-2743

Reich K, Huffmeier U, Konig IR, Lascorz J, Lohmann J, Wendler J, Traupe H, Mossner R, Reis A, Burkhardt H. TNF polymorphisms in psoriasis: association of psoriatic arthritis with the promoter polymorphism TNF\*-857 independent of the PSORS1 risk allele. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2056-2064

Reider N, Reider D, Ebner S, Holzmann S, Herold M, Fritsch P, Romani N. Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 89-95

Ring J, Bachert C, Bauer CP, Czech W editors. *Weißbuch Allergie in Deutschland*. München: Urban & Vogel; 2009.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal MR, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283: 1183-1186

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196: 137-151

Ryu JH, Yoo JY, Kim MJ, Hwang SG, Ahn KC, Ryu JC, Choi MK, Joo JH, Kim CH, Lee SN, Lee WJ, Kim J, Shin DM, Kweon MN, Bae YS, Yoon JH. Distinct TLR-mediated pathways regulate house dust mite-induced allergic disease in the upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131: 549-561

Saikh KU, Kissner TL, Sultana A, Ruthel G, Ulrich RG. Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173: 7426-7434

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109-1118

Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, Itami S, Nickoloff BJ, DiGiovanni J. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* 2005; 11: 43-49

Schmidt M, Anton K, Nordhaus C, Junghans C, Wittig B, Worm M. Cytokine and Ig-production by CG-containing sequences with phosphodiester backbone and dumbbell-shape. *Allergy* 2006; 61: 56-63

Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001; 2: 947-950

Schramm G, Haas H. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes Infect* 2010; 12: 881-888

Schroder JM, Reich K, Kabashima K, Liu FT, Romani N, Metz M, Kerstan A, Lee PH, Loser K, Schon MP, Maurer M, Stoitzner P, Beissert S, Tokura Y, Gallo RL. Who is really in control of skin immunity under physiological circumstances - lymphocytes, dendritic cells or keratinocytes? *Exp Dermatol* 2006; 15: 913-929

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-1782

Staege H, Schaffner A, Schneemann M. Human toll-like receptors 2 and 4 are targets for deactivation of mononuclear phagocytes by interleukin-4. *Immunol Lett* 2000; 71: 1-3

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-296

Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* 1975; 141: 804-820

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259-1260

Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000; 55 Suppl 1: S2-10

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000a; 165: 5392-5396

Takeuchi O, Kawai T, Muhlrath PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13: 933-940

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10-14

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000b; 12: 113-117

Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med* 2000; 192: 405-412

Taube C, Duez C, Cui ZH, Takeda K, Rha YH, Park JW, Balhorn A, Donaldson DD, Dakhama A, Gelfand EW. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol* 2002; 169: 6482-6489

Terhorst D, Kalali BN, Ollert M, Ring J, Mempel M. The role of toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases. *Am J Clin Dermatol* 2010; 11: 1-10

Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Van NG, Tuck S, Eiden JJ, Kagey-Sobotka A, Creticos PS, Lichtenstein LM, Spiegelberg HL, Raz E. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 124-134

Tulic MK, Fiset PO, Christodoulopoulos P, Vaillancourt P, Desrosiers M, Lavigne F, Eiden J, Hamid Q. Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* 2004a; 113: 235-241

Tulic MK, Fiset PO, Manoukian JJ, Frenkiel S, Lavigne F, Eidelman DH, Hamid Q. Role of toll-like receptor 4 in protection by bacterial lipopolysaccharide in the nasal mucosa of atopic children but not adults. *Lancet* 2004b; 363: 1689-1697

van Vliet SJ, den DJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van KY. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 435-440

van FR, Diesselhoff-den Dulk MC, Mattie H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J Exp Med* 1973; 138: 1314-1330

Volkman A, GOWANS JL. THE ORIGIN OF MACROPHAGES FROM BONE MARROW IN THE RAT. *Br J Exp Pathol* 1965; 46: 62-70

Volz T, Nega M, Buschmann J, Kaesler S, Guenova E, Peschel A, Rocken M, Gotz F, Biedermann T. Natural Staphylococcus aureus-derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate immune system exclusively in the presence of TLR signals. *FASEB J* 2010; 24: 4089-4102

von BD, Fimmers R, Bogdanow M, Matz H, Koch S, Bieber T. Asymptomatic atopy is associated with increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interleukin-10 production during seasonal allergen exposure. *Clin Exp Allergy* 2004a; 34: 1056-1063

von BD, Geiger E, Bieber T. Antigen-presenting cells in allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 329-339

von BD, Scheler M, Hinz T, Matz H, Koch S, Bieber T. Comparative immunophenotyping of monocytes from symptomatic and asymptomatic atopic individuals. *Allergy* 2004b; 59: 933-939

von ME. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology* 2007; 212: 433-439

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412: 346-351

Whitton JL, Zhang J. Principles of cytotoxic T lymphocyte induction and recognition. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 202: 247-259

Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 1999; 270: 41-49

- Wollenberg A, Wen S, Bieber T. Langerhans cell phenotyping: a new tool for differential diagnosis of inflammatory skin diseases. *Lancet* 1995; 346: 1626-1627
- Xiang LX, He D, Dong WR, Zhang YW, Shao JZ. Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of bacteria-challenged *Lateolabrax japonicus* reveals insight into the immune-relevant genes in marine fish. *BMC Genomics* 2010; 11: 472
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4: 1144-1150
- Yang D, Howard OM, Chen Q, Oppenheim JJ. Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J Immunol* 1999; 163: 1737-1741
- Yoshioka M, Fukuishi N, Iriguchi S, Ohsaki K, Yamanobe H, Inukai A, Kurihara D, Imajo N, Yasui Y, Matsui N, Tsujita T, Ishii A, Seya T, Takahama M, Akagi M. Lipoteichoic acid downregulates FcepsilonRI expression on human mast cells through Toll-like receptor 2. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 452-461
- Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 2588-2592
- Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 584-592
- Zuany-Amorim C, Hastewell J, Walker C. Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 797-807

