

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
der Technischen Universität München  
am Biederstein  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

Die Immunantwort dendritischer Zellen atopischer und nicht-atopischer  
Spender auf Toll-like Rezeptor Agonisten

Mette-Sophie Dorothea Terhorst

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. W. Mempel
2. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt

Die Dissertation wurde am 17.09.2007 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.01.2008  
angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Immunsystem</b>	<b>1</b>
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2	Das erworbene (adaptive) Immunsystem	2
<b>1.2</b>	<b>Dendritische Zellen (DCs)</b>	<b>3</b>
1.2.1	DC-Subgruppen	4
1.2.2	Antigenpräsentation	5
1.2.3	Aktivierung und Polarisierung von T-Zellen	7
<b>1.3</b>	<b>Toll-like-Rezeptoren (TLRs)</b>	<b>10</b>
1.3.1	TLRs und ihre Liganden	11
1.3.2	TLR- Expression auf dendritischen Zellen	14
<b>1.4</b>	<b>Allergie und Atopie</b>	<b>15</b>
1.4.1	Immundefunktion bei Atopie und atopischem Ekzem	16
1.4.2	Spezifische Immuntherapie	18
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Probanden, Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Probanden</b>	<b>22</b>
3.1.1	Patienten mit atopischer Disposition	22
3.1.2	Kontrollgruppe	24
<b>3.2</b>	<b>Material</b>	<b>25</b>
3.2.1	Zellkulturmaterial	25
3.2.2	Standardpuffer und Medien	25
3.2.3	TLR-Agonisten	26
3.2.4	Antikörper	26
3.2.5	ELISA-Kits	27
3.2.6	Geräte	27
<b>3.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
3.3.1	Generierung dendritischer Zellen (DCs)	28
3.3.1.1	Allgemeine Arbeitstechniken mit Zellen	28
3.3.1.2	Isolieren von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs)	28
3.3.1.3	Differenzierung von dendritischen Zellen	29
3.3.1.4	Stimulation der dendritischen Zellen	29
3.3.2	Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	31
3.3.2.1	Prinzip	31
3.3.2.2	Färben der Zellen und Messung	31
3.3.3	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)	33
3.3.3.1	Prinzip	33
3.3.3.2	IL-12 und TNF- $\alpha$ ELISAs	33

3.3.4	Magnetic Associated Cell Sorting (MACS)	34
3.3.4.1	Prinzip	34
3.3.4.2	Isolierung der CD1a+ Zellen	34
3.3.5	RNA- Präparation	35
3.3.6	cDNA- Synthese	36
3.3.7	Polymerase chain reaction (PCR)	37
3.3.7.1	Real Time PCR	38
3.3.8	Genetische Analyse	40
3.3.9	Statistische Analyse	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung unstimulierter dendritischer Zellen</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Nachweis der konstitutiven TLR- Expression in humanen, von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen</b>	<b>47</b>
4.2.1	Aufreinigung von dendritischen Zellen für die PCR	47
4.2.2	Ergebnisse der Real Time PCR	48
<b>4.3</b>	<b>Nachweis des Einflusses von TLR- Agonisten auf die Oberflächenmarkerexpression humaner, von Monozyten abgeleiteter dendritischer Zellen</b>	<b>50</b>
4.3.1	Stimulation mit PGN	50
4.3.2	Stimulation mit Poly IC	53
4.3.3	Stimulation mit LPS	56
4.3.4	Stimulation mit Flagellin	59
4.3.5	Stimulation mit CpG und Non-CpG	62
4.3.6	Vergleich der Stimulationen	62
<b>4.4</b>	<b>Nachweis der IL-12 und TNF-<math>\alpha</math> Induktion auf Proteinebene</b>	<b>65</b>
<b>4.5</b>	<b>Genetische Analyse</b>	<b>66</b>
<b>4.6</b>	<b>Nachweis der Expression von RIG-I und PKR</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>98</b>
<b>11</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>99</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunsystem

Allergische und atopische Reaktionen sind immunologisch bedingt. Deshalb erscheint zum Verständnis dieser Immunreaktionen und ihrer kausalen Therapien eine kurze Darstellung des menschlichen Immunsystems förderlich.

Das Immunsystem ist ein hochkomplexes System, welches aus einer Fülle von Zellen und Substanzen besteht, die unter anderem auf die Abwehr von Infektionen spezialisiert sind. Alle Zellen des Immunsystems stammen von den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab. Aufgrund der unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen wird das Immunsystem in die angeborene und erworbene Immunantwort unterteilt.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus phylogenetisch konservierten Abwehrmechanismen, die gleichermaßen bei Säugetieren, Insekten und Pflanzen zu finden sind (Hofmann et al., 1999). Diese angeborenen Maßnahmen werden auch als unspezifisch bezeichnet, da sie unabhängig vom jeweils eindringenden Erreger vermittelt werden.

Zu den ersten Hürden, die eindringende Keime überwinden müssen, gehören der Säuremantel der Haut sowie die intakte Epidermis. Neben der physikalischen Barriere zählen auch die Moleküle des Komplementsystems, antimikrobielle Enzymsysteme wie Lektine und Defensine, sowie unspezifische Mediatoren wie Interferone und Interleukine zu dieser „First-line of defense“, die innerhalb von Minuten nach erfolgter Infektion reagieren kann (Medzhitov, 2001).

Zu den Zellen des unspezifischen Abwehrsystems gehören Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen (DCs), welche aufgrund ihrer Fähigkeit, eingedrungene Fremdantigene durch Phagozytose aufzunehmen, auch als Phagozyten bezeichnet werden. Zusätzlich sind Mastzellen (MZs), die hauptsächlich für die Auslösung allergischer Reaktionen verantwortlich sind, und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu nennen, die eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität gegen Viren und andere intrazelluläre Krankheitserreger spielen.

Janeway stellte 1989 das Konzept der PRRs, „pattern recognition receptors“, vor: Hierbei handelt es sich um Rezeptoren, welche spezielle molekulare Musterstrukturen des Stoffwechsels von Pathogenen erkennen, die sogenannten PAMPs („pattern associated molecular patterns“) (Janeway, 1989). Diese Rezeptoren werden in drei Gruppen eingeteilt. Zu der ersten Gruppe der sezernierten PRRs gehören z.B. die Faktoren des Komplementsystems und die dazugehörigen Komplementrezeptoren auf Immunzellen. Die Endozytose- assoziierten PRRs bilden die zweite Gruppe, ein Beispiel ist der Mannose- Rezeptor der Makrophagen und DCs, welcher den für Mikroorganismen typischen, an Mannoseresten reichen Zucker erkennt (Aderem und Underhill, 1999; Fraser et al., 1998). Die dritte Gruppe bilden die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), auf die unter 1.3 noch genauer eingegangen wird. Die Zellen des angeborenen Immunsystems spielen bei der Auslösung und der anschließenden Steuerung der adaptiven Immunreaktion eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund nehmen einige Zelltypen des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise DCs (siehe 1.2), eine Zwischenstellung zwischen den beiden Immunsystemen ein.

### **1.1.2 Das erworbene (adaptive) Immunsystem**

Das adaptive Immunsystem, das erstmals bei Wirbeltieren zu finden ist, zeichnet sich durch eine Vielfalt an Rezeptoren, ein Gedächtnis, und die Möglichkeit der Selbst-Fremd- Unterscheidung aus. Im Unterschied zum angeborenen ist das adaptive Immunsystem höchst spezifisch in der Erkennung fremder Molekülstrukturen.

Die wichtigsten Elemente der spezifischen Immunantwort, die T- und B-Lymphozyten, sind mit charakteristischen Oberflächenrezeptoren ausgestattet (T-Zellrezeptoren bzw. membranständige Immunglobuline), deren antigenerkennenden Abschnitte durch genetische Rekombination eine enorme Diversität aufweisen. Durch diese Vielfalt wird eine hohe Präzision in der Antigenerkennung und damit die Spezifität der Immunantwort ermöglicht. Der Erstkontakt mit einem Fremdanigen geschieht in den weitaus meisten Fällen in den sekundären lymphatischen Organen, vor allem in Lymphknoten und Milz. Dieser Kontakt führt innerhalb von Tagen zur Aktivierung der antigenspezifischen Lymphozyten und zur klonalen Expansion und Differenzierung zu Effektor- und nachfolgend zu Gedächtniszellen, wobei letztere für das immunologische Gedächtnis verantwortlich sind (Janeway et al., 2001).

Die Aufgabe der B-Zellen besteht darin, körperfremde Antigene zu erkennen und Antikörper (Ak, Immunglobuline) dagegen zu produzieren. Bislang sind fünf Klassen

von Immunglobulinen (Ig) beschrieben worden, die mit IgG, IgM, IgA, IgD und IgE bezeichnet und in mehrere Subklassen unterteilt werden können.

Diese Art der B- Zell- induzierten Immunabwehr wird auch als humorale Immunität bezeichnet.

Im Unterschied dazu induzieren T-Zellen eine Immunantwort, welche auch als zelluläre Immunantwort bekannt ist. Für die Auslösung dieser Reaktion und der damit verbundenen Aktivierung der T-Zellen sind allerdings Zellen des angeborenen Immunsystems notwendig, wie zum Beispiel Makrophagen oder DCs. Mittels des T-Zellrezeptors (TCR) erkennen T-Lymphozyten spezifische Peptidantigene, welche ihnen auf Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC- „major histocompatibility complex“) präsentiert werden. Hierbei unterscheidet man zwischen MHC-Molekülen der Klasse I (MHC-I-Moleküle), welche sich auf der Oberfläche jeder kernhaltigen Zelle befinden, und MHC-Molekülen der Klasse II (MHC-II-Moleküle), die fast ausschließlich von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert werden. Zu den APCs gehören Makrophagen, B-Zellen und DCs. Die Einteilung der T-Lymphozyten erfolgt in  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen (Th-Zellen), welche MHC-Moleküle der Klasse II erkennen und in  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen, welche mit MHC-Molekülen der Klasse I interagieren. Die Präsentation endogener Antigene durch infizierte oder entartete Zellen über MHC-I-Moleküle führt zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, wodurch es zur Eliminierung dieser Zellen kommt. Im Gegensatz dazu nehmen APCs exogene Fremdproteine auf, prozessieren sie und präsentieren sie über MHC-II-Moleküle den Th-Zellen. Abhängig von weiteren Faktoren, auf die im Abschnitt 1.2.4 noch näher eingegangen wird, kommt es zur Proliferation und zur Differenzierung der naiven Th-Zellen in Th1- bzw. Th2-Zellen. Diese spielen unter anderem bei der Aktivierung von B-Zellen und der daraus folgenden Differenzierung zu Antikörper produzierenden Plasmazellen eine entscheidende Rolle (Janeway et al., 2001).

## **1.2 Dendritische Zellen (DCs)**

1868 beschrieb der Medizinstudent Paul Langerhans erstmals dendritische Zellen in der menschlichen Haut, die er allerdings für Hautnerven hielt (Langerhans, 1868). Ein Jahrhundert später isolierten Steinman und Cohn aus der Milz von Mäusen Zellen, die sie aufgrund ihrer lang gestreckten Fortsätze als „dendritische Zellen“ bezeichneten (Steinman und Cohn, 1973).

Dendritische Zellen (DCs) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen und spielen, wie bereits erwähnt, eine zentrale Rolle im angeborenen und erworbenen Immunsystem. Es handelt sich um eine sehr heterogene Gruppen von Zellen, die je nach Reifegrad unterschiedliche Funktionen haben.

DC- Stammzellen im Knochenmark bilden Vorläuferzellen, welche übers Blut ins periphere Gewebe wandern, wo sie als unreife DCs nicht aktiv sind. Werden diese unreifen DCs durch Gewebeschaden oder Pathogene aktiviert, nehmen sie die Antigene auf und wandern in die lymphatischen Organe, um die seltenen antigenspezifischen, zirkulierenden T-Zellen zu aktivieren und so die Immunantwort zu initiieren.

DCs präsentieren die Antigene CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, welche weitere Zellen aktivieren: Ag- spezifische CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, B-Zellen, so wie die nicht Ag-spezifischen Makrophagen, Eosinophile und NK Zellen. DCs setzen also ein äußerst komplexes System von verschiedenen Zellen ein, welches unter unterschiedlichen Bedingungen zur Immunantwort oder zu Toleranz führt (Banchereau et al., 2000).

### **1.2.1 DC-Subgruppen**

Verschiedene DC-Typen, welche in spezifischen Organen bzw. Geweben lokalisiert sind und ein unterschiedliches Repertoire an Toll-like-Rezeptoren (siehe 1.3) exprimieren, ermöglichen die gezielte Reaktion auf eindringende Pathogene.

Alle DC-Subtypen stammen von einer CD34<sup>+</sup> Knochenmarksstammzelle ab (Shortman und Liu, 2002). In Abhängigkeit von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen erfolgt aus dieser hämatopoetischen Stammzelle die Differenzierung der verschiedenen DC-Subpopulationen. DCs im lymphatischen Gewebe beinhalten eine myeloide oder auch konventionell genannte Population und eine Population, die aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit Plasmazellen als plasmazytoid bezeichnet wird.

Die erst später charakterisierten plasmazytoiden DCs exprimieren weniger MHC und kostimulatorische Moleküle als die konventionellen, myeloiden DCs (Grouard et al., 1997). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Abwehr viraler Infektionen (Barchet et al., 2005).

Die Gruppe der myeloiden oder konventionellen DCs beinhaltet dendritische Zellen, die aus CD14<sup>+</sup> Monozyten gewonnen werden (mDCs), dermale DCs oder interstitielle DCs (DDC- IDCs) und die Langerhans-Zellen der Epidermis (LCs) (Rossi und Young, 2005).

Die Differenzierungsfähigkeit von Monozyten zu DCs wurde erstmals von Sallusto und Lanzavecchia 1994 bewiesen, die *in vitro* aus humanen peripheren Monozyten unter Einfluss von Granulozyten- Makrophagen- Kolonie- stimulierenden Faktor (GM-CSF) und IL-4 mDCs kultivierten (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Diese Entdeckung hat viele folgende Studien ermöglicht, die zuvor an der Schwierigkeit, *in vitro* humane DCs zu isolieren, gescheitert waren (Léon et al., 2005). Auch im Rahmen dieser Studie wurde mit mDCs experimentiert.

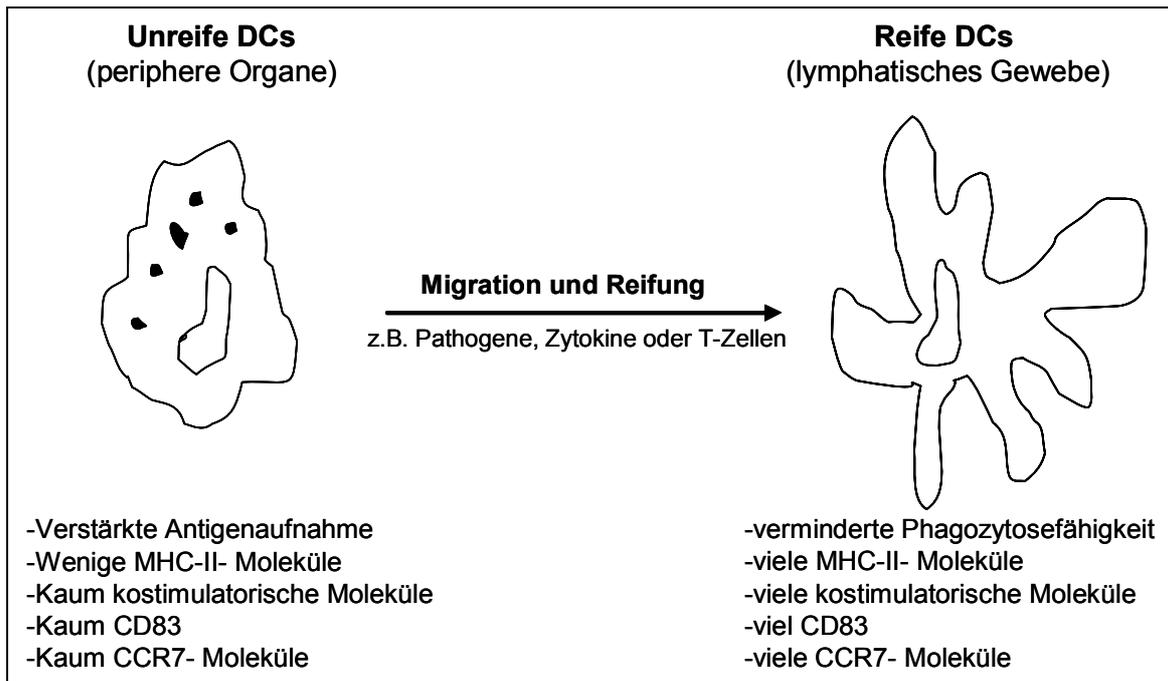
Die Differenzierung von LCs ist TGF- $\beta$  abhängig (Geissmann et al., 1998), sie werden charakterisiert durch Birbeck- Granula und die Expression von E-Cadherin (Wolff und Stingl, 1983). Die TLR 1-10 Expression menschlicher LCs ist vergleichbar mit der von mDCs (Renn et al., 2006). LCs sind also komplett ausgestattete Immunzellen, die die verschiedenen PAMPs erkennen können. Im Gegensatz dazu zeigten epidermale murine LCs eine niedrigere TLR-Expression und eine eingeschränkte Sensitivität gegenüber bakteriellen Komponenten (Takeuchi et al., 2003; Fujita et al., 2005; Mitsui et al., 2004). Die murinen LCs regulieren jedoch ihre Oberflächenrezeptoren während der Extraktion und *in vitro* herunter.

### **1.2.2 Antigenpräsentation**

In den Geweben lokalisierte unreife DCs besitzen effiziente Mechanismen zur Antigenaufnahme. Dazu gehört der Endozytose vermittelnde Mannose-Rezeptor (siehe 1.1.2).

Dendritische Zellen werden durch eine Reihe verschiedener Einflüsse der Umgebung aktiviert. So stellen mikrobielle Produkte einen physiologischen Aktivierungsstimulus über TLRs dar (Kadowaki et al., 2001; Jarossay et al., 2001). Die Reifung kann u.a. auch durch verschiedene Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6, sowie CD40-Ligand, welcher von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, ausgelöst werden (Jonuleit et al., 1997; Caux et al., 1994).

Die DCs wandern innerhalb der lymphatischen Gefäße zu den drainierenden lymphoiden Organen. Während dieser Migration reifen sie heran, wodurch sie sich zu effizienten antigenpräsentierenden Zellen entwickeln.



**Abbildung 1.1 Veränderung der Morphologie und des Phänotyps bei der DC- Reifung**

Nach Induktion der Reifung werden die aufgenommenen Antigene prozessiert (Inaba et al., 2000) und die zur Antigenpräsentation notwendigen MHC-II-Peptidkomplexe gebildet (Cella et al., 1997). Antigene, welche von der extrazellulären Umgebung aufgenommen werden, werden typischerweise über MHC-II-Moleküle dargereicht, wohingegen MHC-I-Moleküle Antigene aus dem Zytosol tragen. DCs sind allerdings auch in der Lage, exogen aufgenommene Antigene über MHC-I-Moleküle zu präsentieren, was als „Kreuz- Präsentation“ bezeichnet wird (Shen et al., 1997).

Beim Menschen bezeichnet man MHC auch mit HLA (human leukocyte antigen) mit den Untergruppen HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP.

Neben der verstärkten Expression von MHC-Molekülen kommt es ebenfalls zur Zunahme der Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie CD40, CD80 und CD86 (Abb. 1.1). Außerdem wird der Reifungsmarker CD83 hochreguliert, dessen Funktion noch nicht vollständig erforscht ist (Lechmann et al., 2002).

Auch der Chemokin- Rezeptor CCR7 wird verstärkt exprimiert (Abb. 1.1). Die Bindung von CCR7 an seine Liganden SLC und ELC, welche von lymphatischen Endothelzellen produziert werden (Gunn et al., 1999), ist eines der Moleküle, welche die DCs in die Lymphknoten bringen (Saeki et al., 1999). Ihre Fähigkeit, Antigene zu phagozytieren, verlieren die DCs allerdings während des Reifungsprozesses (They and Amigorena, 2001). Zusätzlich zu diesen phänotypischen Veränderungen kommt

es durch Ausbildung langer zytoplasmatischer Fortsätze, welche als „Dendriten“ bezeichnet werden, auch zu morphologischen Veränderungen (Abb. 1.1).

Weiterhin existiert der so genannte CD1-Prozessierungsweg, der für die Aufnahme und Verarbeitung von Lipiden von Bedeutung ist. Bislang wurden fünf humane (CD1a-e) CD1-Moleküle charakterisiert (Porcelli et al., 1998). Hinsichtlich ihrer Struktur ähneln sie dem MHC-I-Molekül, werden allerdings in endosomalen Zellkompartimenten beladen wie MHC-II-Moleküle. Somit werden auch exogene Lipid-Antigene über CD1-Moleküle den verschiedenen T-Zellpopulationen präsentiert (Brigl und Brenner, 2004). CD1a ist außerdem ein Marker, mit dem die myeloiden Formen der DCs charakterisiert werden können (Rossi und Young, 2005).

### **1.2.3 Aktivierung und Polarisierung von T-Zellen**

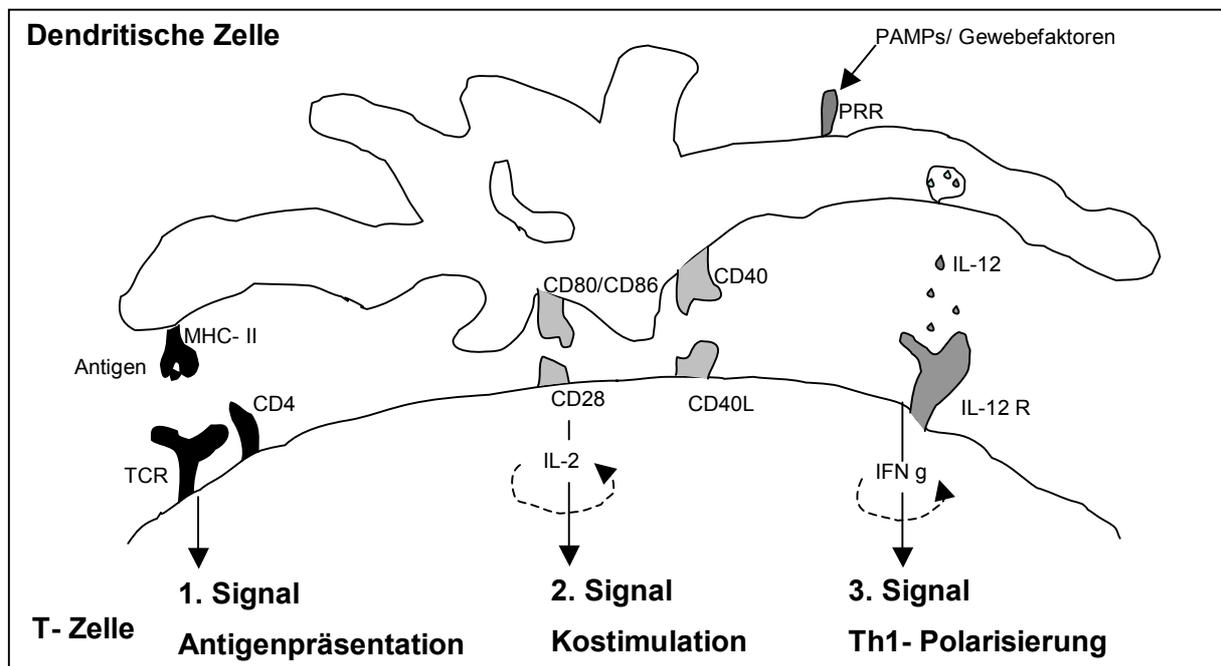
Nachdem die DCs im Lymphknoten angelangt sind, aktivieren sie nicht nur die klonale Proliferation der T-Lymphozyten, sondern sind auch für deren Differenzierung in Effektorzellen entscheidend (Steinmann et al., 1999).

Das Schicksal der T-Zellen wird durch 3 Signale bestimmt, welche von den reifen DCs ausgehen. In den T-Zell-Arealen des regionären Lymphknotens präsentieren DCs die antigenen Strukturen auf MHC-I und II-Molekülen zur Erkennung durch T-Zellrezeptoren von naiven T-Zellen.

Der T-Zellrezeptor bindet während der Antigenpräsentation mit seiner mittleren hochvariablen, sog. CDR3-Region das Antigen und die polymorphen Anteile des MHC-Moleküls. Das CD4+ Molekül bindet an die monomorphen Teile des MHC-II-Moleküls und dient der Stabilisierung der Interaktion (Abb. 1.2). Diese DC- und T-Zellinteraktion stellt das erste Signal der T-Zellaktivierung dar.

Für die Induktion der Immunantwort sind allerdings noch weitere Signale notwendig. Durch die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen, wie CD80 und CD86 mit CD28, welches konstitutiv auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird, kommt es zur Induktion der IL-2 Synthese. IL-2 ist essentiell für die klonale Expansion von T-Zellen und wird nach Aktivierung von ihnen selbst produziert. Aus diesem Grund ist die Interaktion zwischen CD80 bzw. CD86 mit CD28 ein weiteres Signal, welches für die Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen essentiell ist (Abb. 1.2). Induziert durch die Aktivierung der T-Zellen wird auf deren Oberfläche ein Molekül exprimiert, welches als CD40-Ligand oder auch als CD154 bezeichnet wird. Durch Interaktion von CD154 mit CD40 nimmt die Expression von kostimulatorischen

Molekülen weiter zu, wodurch wiederum die Aktivierung naiver T-Zellen verstärkt wird (Abb. 1.2). Die kostimulatorischen Signale werden als Signal 2 bezeichnet.



**Abbildung 1.2 Polarisierung von Th1 Effektorzellen**

Für die Differenzierung von Th-Zellen in Th1- und Th2-Effektorzellen ist das Signal 3 notwendig, die Sekretion von bestimmten, immunmodulatorischen Zytokinen. Essentiell für die Polarisierung zu Th1-Effektorzellen ist IL-12, welches von aktivierten DCs in den T-Zellarealen sezerniert wird (Abb. 1.2). Hierbei handelt es sich um das bioaktive IL-12p70, ein Heterodimer, bestehend aus einer p40 und einer p35 Untereinheit (Heufler et al., 1996). TLRs, welche auf der Oberfläche von DCs exprimiert werden und auf die später noch genauer eingegangen wird (siehe 1.3), spielen durch die Erkennung spezifischer pathogener Strukturen eine entscheidende Rolle bei der Sekretion von IL-12. Weitere Erkenntnisse belegen auch, dass zusätzliche Mitglieder der IL-12 Familie, wie IL-23 oder IL-27 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Th1-Zellen spielen (Trinchieri et al., 2003).

Die Stimulation von naiven Th-Zellen durch IL-12 führt zur vermehrten IFN- $\gamma$  Produktion, wodurch es zu einer verstärkten Th1-Polarisierung kommt (Hilkens et al., 1997).

Im Unterschied zur Th1-Polarisierung ist der genaue Mechanismus der Th2-Polarisierung noch nicht eindeutig geklärt. Anfänglich ging man davon aus, dass allein die Abwesenheit von IL-12 ausreicht, um Th2-Immunantworten zu induzieren

(Langenkamp et al., 2000). Zusätzlich weisen Daten darauf hin, dass das für die Th2-Polarisierung notwendige Zytokin IL-4 vermutlich ausschließlich von T-Zellen selbst produziert wird (Kopf et al., 1993). Weitere Faktoren, die Th-Zellen zu IL-4 produzierenden Th2-Zellen polarisieren, sind CC-Chemokin Ligand 2 (CCL2) und OX40L (Kapsenberg, 2003, Ohshima et al., 1998).

Th1-Immunantworten dominieren vor allem bei klassischen, inflammatorischen Prozessen oder bei viralen Infektionen (Komastu et al., 1998). Die Th1-Antwort ist auch bei der „delayed type hypersensitivity“ (DTH) vorherrschend. Ein klassisches Beispiel dafür ist die Tuberkulinreaktion. Typische Zytokine, welche von Th1-Zellen produziert werden, sind Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-2 und die Tumornekrosefaktoren alpha (TNF- $\alpha$ ) und beta (TNF- $\beta$ ) (Abb. 4). Im Gegensatz dazu findet man Th2-Immunantworten hauptsächlich im Rahmen von Allergien und Parasiteninfektionen (Jankovic et al., 2004). Typische Zytokine, welche von Th2-Zellen sezerniert werden, sind IL-4, IL-5 und IL-13 (Abb.1.3).

IFN- $\gamma$  der Th1-Zellen ist eines der wichtigsten Aktivierungssignale für Monozyten und Makrophagen (Black et al., 1987). Die von Th2-Zellen produzierten Zytokine hingegen induzieren die IgE-Produktion (IL-4, IL-13) und fördern die Reifung eosinophiler Granulozyten (IL-5).

Th1- und Th2-Reaktionen beeinflussen sich gegenseitig, so hemmt IL-4 die Bildung von Makrophagen, wohingegen IFN- $\gamma$  die IgE-Produktion hemmt. Die Beeinflussung dieses Th1/Th2-Gleichgewichts ist auch ein wesentlicher Angriffspunkt immuntherapeutischer Anstrengungen.

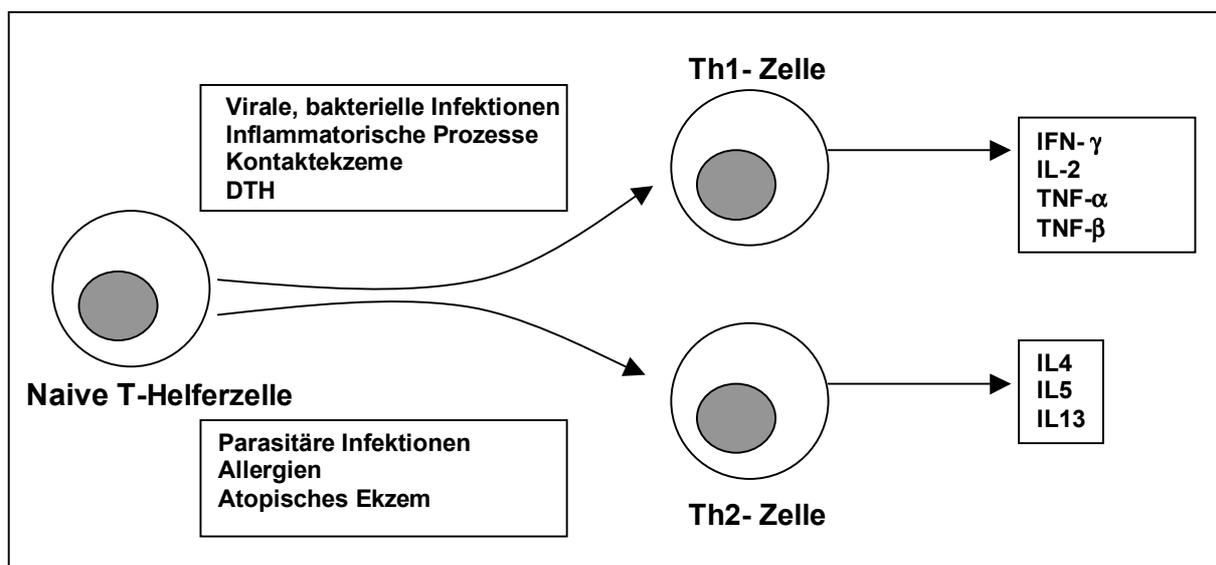


Abbildung 1.3 Th1 und Th2- Immunantwort

Bislang sind unterschiedliche Modelle für die Polarisierung von naiven Th-Zellen in Th1- bzw. Th2-Zellen beschrieben worden. Eines der Modelle besagt, dass unterschiedliche DC-Subtypen ausschlaggebend für die Polarisierung von Th-Zellen sind (Moser und Rock, 2000; Banchereau et al., 2000). Ein weiteres Modell wiederum geht davon aus, dass unabhängig vom DC-Typ verschiedene Antigene der Grund für die Differenzierung von Th1- bzw. Th2-Effektorzellen sind (Kapsenberg, 2003).

Auch scheint die Dosis des Antigens wichtig zu sein, so fördern hohe Antigenkonzentrationen Th1-Muster, während niedrige Antigendosen sowie die Gegenwart von IL-4 zur Ausprägung einer Th2-Reaktion führen (Blaser et al., 1998).

### **1.3 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)**

Wie bereits erwähnt, exprimieren DCs neben anderen Rezeptoren auch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) auf ihrer Oberfläche. Diese sind genetisch determiniert und gehören zur Familie der „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs), welche gezielt zwischen körperfremden und körpereigenen Antigenen unterscheiden. Durch Erkennen konservierter, spezifischer pathogener Strukturen, so genannter „Erreger-assoziiertes molekularer Muster“ („pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs), kommt es zur Aktivierung von DCs und somit zur Induktion der erworbenen Immunität (Takeda et al., 2003).

Ihren Namen erhielten diese Rezeptoren aufgrund ihrer Homologie mit dem Toll-Gen der Fruchtfliege *Drosophila*. Dieses hochkonservierte Transmembranprotein wurde zuerst im Zusammenhang mit der dorsoventralen Ausrichtung in der Embryonalentwicklung der *Drosophila* beschrieben (Anderson et al., 1985; Hashimoto, 1988).

Durch Zufall wurde eine bedeutende Rolle dieses Rezeptors in der Abwehr von Pilzinfektionen der *Drosophila* entdeckt (Lemaitre et al., 1996). Bei der Durchsicht von humanen Gendatenbanken wurde kurz darauf eine dem *Drosophila*-Toll-Gen verwandte Sequenz im menschlichen Genom identifiziert, welche später humaner TLR1 getauft wurde (Nomura et al., 1994). Es dauerte bis 1997, als Janeway und seine Mitarbeiter auf ihrer Suche nach Erkennungsstrukturen des angeborenen humanen Immunsystems das erste strukturhomologe Protein des *Drosophila*-Toll im humanen System, hTLR4, identifizierten (Medzhitov et al., 1997).

Erste funktionelle Untersuchungen bestätigten die Bedeutung dieser Proteinklasse auch für das angeborene Immunsystem des Menschen. So führte die Überexpression dieses Proteins in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren. Ferner wurde auch die postulierte Rolle in der Induktion einer adaptiven Immunität bekräftigt, da Zelllinien, die dieses Protein stark exprimieren, zur Aktivierung von naiven T-Zellen führen. Den eindeutigen Beweis, der TLR4 als einen PRR des angeborenen Immunsystems schlechthin klassifizierte, brachte die Beobachtung, dass TLR4 dem LPS-Erkennungskomplex in der Maus angehört. Poltorak et al. konnten als erste zeigen, dass Mäuse mit spontaner Mutation des TLR4-Gens nicht auf LPS-Stimulation reagierten und somit eine sonst tödliche Endotoxin-Gabe schadlos überstanden (Poltorak et al., 1998).

Auch erste Polymorphismen von einzelnen Nukleotiden (single nucleotide polymorphisms, SNPs) der TLR- Gene wurden beschrieben. Manche dieser SNPs scheinen die Immunantwort auf TLR- Liganden zu beeinträchtigen, was zu einer erhöhten Neigung zu entzündlichen Reaktionen führen kann (Schröder und Schumann, 2005). Diese Mutationen werden vielleicht auch die heute noch nicht verstandene Neigung zu vielen Krankheiten aus der Gruppe der Allergien und atopischen Erkrankungen erklären und neue Ansatzpunkte für Diagnostik und Therapie geben.

### **1.3.1 TLRs und ihre Liganden**

Bislang wurden zehn Mitglieder der humanen TLR- Familie (TLR1-10) genauer charakterisiert (Abb.1.4) und es ist davon auszugehen, dass weitere Vertreter dieser Proteinfamilie im Laufe der Vervollständigung der humanen Gendatenbanken identifiziert werden (Chuang und Ulevitch, 2001).

Während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 intrazellulär, in endosomalen Kompartimenten lokalisiert sind, werden die restlichen TLRs an der Zelloberfläche exprimiert (Abb.1.4) (Heil et al., 2003; Matsumoto et al., 2003).

Für jeden dieser TLR außer TLR10 sind spezifisch konservierte Strukturen verschiedenster Pathogene als Liganden beschrieben worden. Auf einige der Strukturen wird später näher eingegangen.

Durch den Prozess der Rezeptorheterodimerisierung wird das Repertoire an Strukturen, welche durch TLRs erkannt werden, zusätzlich erhöht. So können

manche TLRs untereinander in Wechselwirkung treten und somit zusätzliche PAMPs detektieren (Ozinsky et al., 2000).

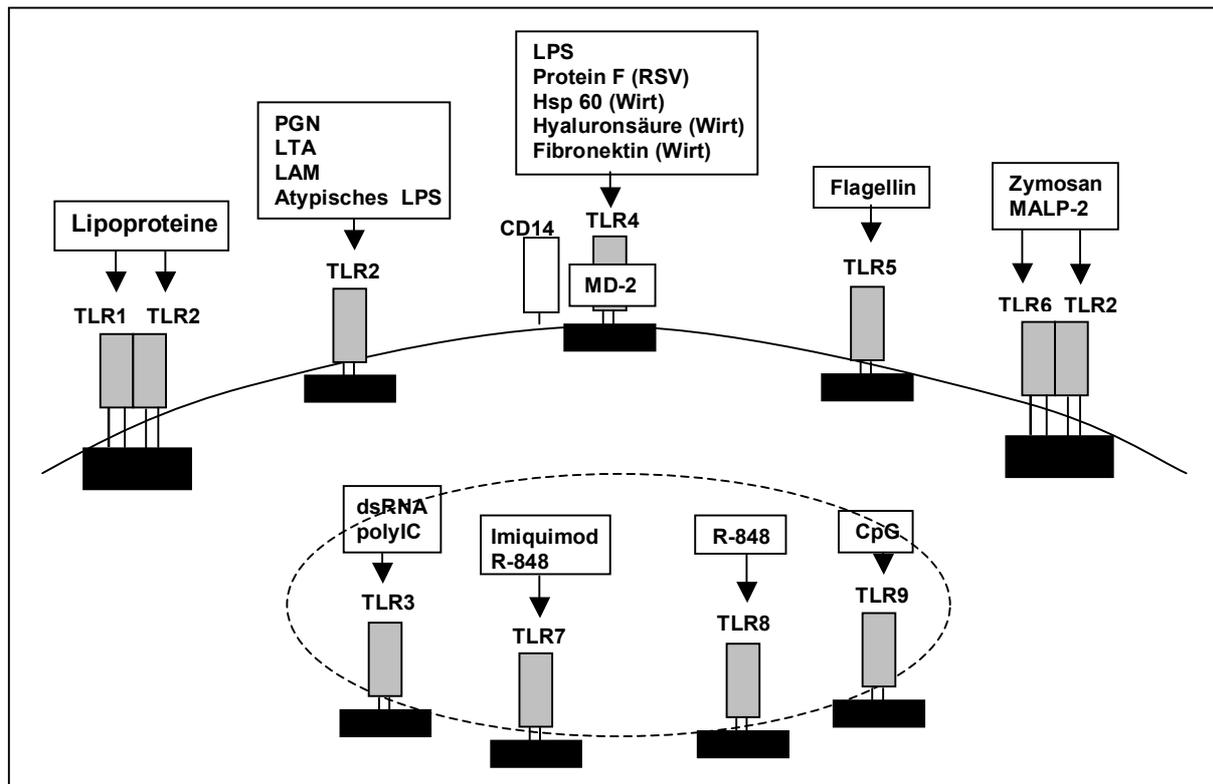


Abbildung 1.4 TLR und einige ihrer Liganden im humanen System

### TLR2, TLR1 und TLR6

TLR2 interagiert hauptsächlich mit Bestandteilen gram-positiver Bakterien, wie beispielsweise Peptidoglykan (PGN) und Lipoteichonsäure (LTA) (Sato et al., 2000b). TLR2 wird außerdem durch Zellwandbestandteile von Mykobakterien wie Lipoarabinomannan (LAM) aktiviert (Underhill et al., 1999).

Zusätzlich bildet TLR2 einen Rezeptor für atypisches Lipopolysaccharid (LPS) z.B. von *Leptospira interrogans*, welches sich in der Struktur von dem LPS gram-negativer Bakterien unterscheidet (Werts et al., 2001).

TLR2 bildet Heterodimere sowohl mit TLR1 als auch mit TLR6 (Underhill und Ozinsky, 2002). In der Kooperation mit TLR1 erkennt TLR2 bakterielle Lipoproteine, welche an ihrem immunstimulierenden Ende dreimal acetyliert sind. Für die Erkennung von nur zweimal acetylierten Lipoproteinen, wie dem mykoplasmalem Makrophagen aktivierendes Lipopeptid 2 (MALP-2), wird allerdings die Kooperation von TLR1 mit TLR6 benötigt (Takeuchi et al., 2001). Auch konnte gezeigt werden, dass eine einseitige Blockade von TLR2 oder TLR6 die Aktivierung muriner Makrophagen durch Zymosan, einem Bestandteil der Hefen, verhindert. Es kann erst

nach Bildung funktioneller Paare der zytoplasmatischen Domänen von TLR2 und TLR6 eine Aktivierung durch Zymosan erfolgen (Ozinsky et al., 2000b).

### TLR3

TLR3 spielt eine wichtige Rolle in der Erkennung doppelsträngiger (ds) RNA, welche während viraler Infektionen gebildet wird. Auch Stimulationen mit dem synthetischen Analogon von viraler dsRNA, „polyinosine-polycytidylic acid“, Poly IC, resultieren in der Aktivierung von NFκB und nachfolgender Interferon-Produktion und führen somit zur Bekämpfung der viralen Infektion (Alexopoulou et al., 2001; Muzio et al., 2000).

### TLR4

Der wichtigste Ligand von TLR4 ist das bakterielle Endotoxin, Lipopolysaccharid (LPS), der Hauptbestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien (Qureshi et al., 1999). Allerdings bindet LPS nicht direkt an TLR4. Liegt freies LPS im Serum vor, wird es von einem Lipopolysaccharid bindenden Protein (LBP) gebunden und dadurch von dem Oberflächenmolekül CD14 erkannt. Da CD14 keine intrazytoplasmatische Domäne besitzt, wird erst durch die Interaktion mit TLR4 die Aktivierung des Signalweges ermöglicht. Als weiteres Molekül ist das extrazelluläre Adaptorprotein MD-2 mit dem homodimeren TLR4 assoziiert. Wie CD14 besitzt MD-2 keine Transmembranregion, kann aber die Sensitivität von TLR4 bezüglich der Erkennung von LPS erhöhen (Medzhitov, 2001).

Auch in der Erkennung von Viren spielt TLR4 eine Rolle wie z.B. in der Detektion des Fusionsprotein Protein F des „respiratory syncytical virus“ (Haynes et al., 2001).

TLR4 reagiert auch auf endogene Bestandteile, die z.B. von beanspruchten oder geschädigten Zellen freigesetzt werden. Unter diese Gruppe lassen sich fragmentierte Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibronectin (Okamura et al., 2001) oder Hyaluronan (Termeer et al., 2001) und auch Hitzeschockproteine subsumieren. Neben TLR4 ist auch TLR2 an der Aktivierung von Immunzellen durch die Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 beteiligt (Asea et al., 2002).

## TLR5

Bakterielles Flagellin, die Hauptproteinstruktur der bakteriellen Geißeln ist der derzeit einzige bekannte Ligand von TLR5. Durch Bildung eines Homodimers wird die Aktivierung der Zellen ermöglicht (Hayashi et al., 2001).

## TLR7 und TLR8

Ebenso wie TLR3 spielen TLR7 und TLR8 eine entscheidende Rolle bei der Erkennung viraler Erreger. Beide TLRs erkennen einzelsträngige (ss) virale RNA, wie z.B. von Influenzaviren oder dem HI-Virus (HIV-1), und rufen eine anti- virale Immunantwort hervor (Heil et al., 2003 und 2004; Diebold et al., 2004).

Zellen, welche diese Rezeptoren exprimieren, können mittels Imidazoquinolinen (z.B. Imiquimod, R-848 = Resiquimod) aktiviert werden (Heil et al., 2003).

Imidazoquinoline sind synthetische Stoffe mit antiviralen und antitumorösen Eigenschaften. Imiquimod (Aldara<sup>®</sup>) ist zur Therapie von aktinischen Keratosen, Basalzellkarzinomen und durch Papillomavirus verursachte genitale Warzen zugelassen (Amlie-Lefond et al., 2005).

TLR7 und TLR8 können unabhängig voneinander auf das Imidazoquinolin R-848 reagieren, was auf eine mögliche Redundanz zwischen diesen beiden Rezeptoren schließen lässt (Heil et al., 2004).

## TLR9

Über TLR9 erfolgt die Erkennung bakterieller genomischer und viraler DNA. Das hochspezifische Erkennungsmuster, das PAMP der DNA, sind die unmethylierten Deoxycytidylat- Phosphat- deoxyguanylat (CpG)- Motive. CpG- Motive kommen in Bakterien 20- mal häufiger vor als in Säugetieren. Zusätzlich ist die DNA von Säugern methyliert, was gewährleistet, dass nur pathogene DNA-Motive zur Zellaktivierung und somit zu einer Immunantwort führen.

Auch synthetische Oligodinukleotide (ODN), die nicht methyliert sind und dieses Motiv enthalten, besitzen eine ähnliche Aktivität (Wagner et al., 2002).

### **1.3.2 TLR- Expression auf dendritischen Zellen**

Die verschiedenen Formen von DCs weisen unterschiedliche Expressionsmuster von TLRs auf und zeigen somit ihre unterschiedliche Reaktivität gegenüber Mikroorganismen und ihre unterschiedlichen Funktionen und Spezialisierungen. Die plasmazytoiden DCs exprimieren fast ausschließlich TLR7 und TLR9 (Jarrossay et

al., 2001). Myeloide DCs, welche aus humanem Blut generiert wurden, zeigen eine gesicherte Expression von TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR8, jedoch keine TLR9 Expression (Jarrossay et al., 2001 ; Ito et al., 2002a ; Seya et al., 2005). Ob humane myeloide DCs TLR7 exprimieren, wird noch kontrovers diskutiert (Jarrossay et al., 2001; Ito et al., 2002b).

Aufgrund dieser breiten Expression an TLRs waren die humanen, von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen ein geeignetes Hilfsmittel für die hier durchgeführten Experimente.

## 1.4 Allergie und Atopie

Der Begriff „Allergie“ wurde erstmals 1906 von dem Wiener Pädiater Clemens von Pirquet in der Münchner Medizinischen Wochenschrift verwandt, der hiermit eine spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus beschrieb. Das Wort Allergie leitet sich von allos (griech.) = anders und ergon (griech.) = Tätigkeit ab. Nach Ring verstehen wir heute unter Allergie eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit (Ring, 2004).

Im Jahre 1963 teilten Coombs und Gell die allergischen Reaktionen in 4 Typen (I bis IV) ein (Coombs und Gell, 1963). Jede Einteilung kann die Natur nur stark vereinfacht und schematisiert darstellen, dennoch hat diese Gliederung bis heute Bestand.

Typ I beinhaltet die klassische allergische, durch Immunglobulin E- vermittelte, Soforttypreaktion, die mit Krankheitsbildern wie allergischer Rhinitis, allergischem Asthma bronchiale, Urtikaria sowie Bienen- und Wespengiftallergie verbunden ist. Pathophysiologisch liegt die Überbrückung zweier IgE-Moleküle auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Leukozyten durch das Allergen und die darauf folgende Freisetzung vasoaktiver Mediatorsubstanzen wie Histamin, Serotonin und Leukotrienen durch Degranulation zugrunde.

Typische Beispiele einer zytotoxischen Reaktion (Typ II) sind die allergische Agranulozytose, die allergische Thrombozytopenie oder die allergische hämolytische Anämie. Antikörper richten sich gegen Oberflächendeterminanten von Zellen, wenn sich z.B. ein Medikament als Hapten an die Oberfläche der Blutzellen bindet, und bewirken so durch Aktivierung des Komplementsystems eine Zellyse.

Die Immunkomplex- Anaphylaxie, die Serumkrankheit, die allergische (Immunkomplex-) Vaskulitis und die exogen allergische Alveolitis stellen klinische

Beispiele einer Immunkomplex- Reaktion dar. Dieser Typ III- Allergie liegt die Bindung zwischen einem zirkulierenden Antikörper (meist IgG) und einem Antigen zugrunde, dieser Komplex führt zur klassischen Komplementaktivierung und zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten.

Die Typ IV- Allergie wird durch sensibilisierte Lymphozyten ausgelöst und umfasst das allergische Kontaktekzem, eine Reihe von Arzneimittelexanthenen und die chronische Phase des atopischen Ekzems.

Später wurden noch die Typ V- Allergie, die granulomatöse Reaktionen wie z.B. das Injektionsgranulom beschreibt, und die Typ VI- Allergie, die stimulierende Überempfindlichkeit wie bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse beinhaltet, etabliert (Ring, 2004).

Der Begriff „Atopie“ (griechisch Atopia = Ungewöhnlichkeit, Seltsamkeit) wurde erstmalig von Coca und Cooke 1923 als klinisches Bild einer Überempfindlichkeitsreaktion bzw. einer allergischen Reaktion vom Typ I beschrieben.

Heute verstehen wir unter Atopie nach Ring die familiär auftretende Neigung zur Entwicklung bestimmter Krankheiten auf dem Boden einer Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhäuten gegen Umweltstoffe, welche mit erhöhter IgE- Bildung und/oder einer veränderten unspezifischen Reaktivität assoziiert ist (Ring, 2004).

Zu dem atopischen Formenkreis gehören die allergische Rhinokonjunktivitis, das allergische Asthma und das atopische Ekzem, wobei es neben diesen klassisch atopischen Krankheitsbildern auch latente Formen und verwandte Erkrankungen gibt.

#### **1.4.1 Immundysfunktion bei Atopie und atopischem Ekzem**

Während die allergische Rhinokonjunktivitis und das allergische Asthma als klassische Beispiele für eine Typ I Reaktion genannt werden können, wird das atopische Ekzem (AE) als eine Mischform von Typ I und Typ IV betrachtet.

So wird auch vermutet, dass die erhöhte IgE- Synthese bei atopischem Ekzem die T-Zell- Dysregulation widerspiegelt.

Zahlreiche Studien haben sowohl für Atopiker allgemein wie für Patienten mit atopischer Dermatitis gezeigt, dass ihre peripheren mononukleären Zellen überwiegend ein Zytokinspektrum des Th2-Subtyps sezernieren (Kimura et al., 1998; Nakazawa et al., 1997; Parronchi et al., 1991; Wierenga et al., 1990).

Auch konnte demonstriert werden, daß akute Hautläsionen von AE- Patienten vorwiegend allergenspezifische T-Zellen des Th2-Typs aufweisen (Van Reijssen et al., 1992).

Wie in Kapitel 1.2.3 dargestellt, induzieren die von Th2-Zellen produzierten Zytokine die IgE-Produktion (IL-4, IL-13), die Reifung eosinophiler Granulozyten (IL-5), blockieren jedoch die Aktivierung von Th1-Zellen und führen somit zu einem relativen Mangel an IFN- $\gamma$  (IL-10). Beachtet man die vielschichtigen Wirkungen von IFN- $\gamma$ , wie z.B. Erhöhung der zytotoxischen Aktivität von Makrophagen und natürlichen Killerzellen, könnte durch den IFN- $\gamma$ -Mangel auch der verminderte Anteil an zytotoxischen T-Zellen und die Anfälligkeit gegenüber Infektionen bei Patienten mit atopischer Dermatitis zu erklären sein (Chandra und Baker, 1983).

Allerdings scheinen chronische Hautläsionen des atopischen Ekzems ein verändertes Zytokinprofil mit Dominanz des Th1-Spektrums aufzuweisen (Grewe et al., 1995; Werfel et al., 1996; Yawalkar et al., 2000). Für diesen Shift ist hauptsächlich eine zunehmende Infiltration durch Eosinophile und Makrophagen und deren Produktion von IL-12 verantwortlich, welche die Differenzierung und Reifung von Th1-Zellen auslöst. Das nun vorherrschende Zytokinmuster mit vorherrschender IFN- $\gamma$ -Produktion wird für die Chronizität und Fortdauer der Erkrankung verantwortlich gemacht (Herz et al., 1998; Thepen et al., 1996).

Obige Darstellungen zeigen also nicht nur den potentiellen Anteil einer defekten zellulären Immunantwort an der Pathogenese der atopischen Dermatitis auf, sondern stellen auch den Zusammenhang zwischen Auffälligkeiten der zellulären Immunität und der bestehenden überschießenden IgE-vermittelten Immunantwort vom Soforttyp dar.

Während im gesunden Organismus nur verschwindend geringe Mengen an IgE vorkommen, so zeigen 80-85% der Patienten mit atopischem Ekzem erhöhte IgE-Spiegel, auch zeigt das atopische Ekzem die höchsten IgE-Spiegel unter den atopischen Erkrankungen (Wittig et al., 1980).

Mit dem Fc-Teil bindet das IgE-Molekül über hochaffine IgE-Rezeptoren (Fc $\epsilon$ RI) an Mastzellen und Basophile, wo der Rezeptor in großer Dichte exprimiert wird, aber auch an Eosinophile, Monozyten, Langerhans-Zellen, dendritische Zellen, bronchiale Epithelzellen und Thrombozyten. Durch überbrückende Bindung von polyvalenten Allergenmolekülen an das an seinen hochaffinen Rezeptor gebundene IgE kommt es zur Aktivierung und Mediatorfreisetzung der entsprechenden Zellen, was neben den

oben genannten proinflammatorischen Mediatoren auch die Freisetzung von, die weitere Immunreaktion modulierenden Zytokinen umfaßt.

Dieses Konzept wird unterstützt durch den Nachweis von IgE-tragenden epidermalen Langerhans-Zellen bei atopischen Patienten, jedoch nicht bei Nicht-Atopikern (Bieber et al., 1989). Auch wird FcεRI bei Patienten mit Atopie stark exprimiert auf allen DCs, inklusive den epidermalen Langerhans Zellen (LCs) (Bieber et al., 1992; Novak et al., 2003).

Das über diesen Rezeptor gebundene IgE kann nach Allergenbindung internalisiert werden und Allergenfragmente mit den zahlreichen MHC-II-Komplexen der Langerhans-Zellen als sehr potente antigenpräsentierende Zellen den T-Lymphozyten dargeboten werden.

Dendritische Zellen werden also als zentrales Verbindungsstück zwischen der Aufnahme von Umweltallergenen und der letztendlich daraus resultierenden klinischen Manifestation gesehen (Novak und Bieber, 2005).

Zudem entscheiden die DCs, ob es zu einer Th2-, welche in akuten Läsionen überwiegt, oder zu einer Th1-Immunantwort kommt, welche in chronischen Hautveränderungen dominiert. Das ist also ein weiterer Grund, wieso die DCs in der Pathophysiologie des AE so wichtig sind.

Außerdem wurde bei dem „atopy patch test“ festgestellt, dass die DCs in großer Zahl in läsionale Haut bei atopischem Ekzem einwandern (Kerschenlohr et al., 2003).

Es wird also angenommen, dass Langerhans Zellen und mDCs welche den hoch affinen IgE-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, zu der Pathogenese von AD beitragen. Deswegen ist es besonders interessant, diese Zellpopulation bei Atopikern und Nicht-Atopikern zu untersuchen.

#### **1.4.2 Spezifische Immuntherapie**

Die spezifische Immuntherapie (SIT) oder Hyposensibilisierung stellt die bisher einzige kausale Behandlungsmethode für Typ-I-Allergien dar.

Vor 100 Jahren berichteten erstmals Noon und Freeman von „prophylaktischen Inokulationen“, Injektionen von Pollenallergenen, mit denen sie die Symptome des Heuschnupfens gebessert haben (Noon, 1911; Freeman, 1914). Heute versteht man unter der SIT die wiederholte Applikation relevanter Allergene in langsam steigender Dosis, bis zum Erreichen einer so genannten Erhaltungsdosis, die eine Besserung oder das Verschwinden der durch das Allergen ansonsten hervorgerufenen

Beschwerden, bewirkt. Diese Erhaltungsdosis wird über einen längeren Zeitraum weiter verabreicht, abhängig von Allergen und Indikation sind das im Durchschnitt 5 Jahre (Ring, 2004).

Die Indikation kann bei entsprechenden Beschwerden gestellt werden, wenn die auslösenden Allergene klar diagnostiziert sind, eine Expositionsprophylaxe nicht möglich und für die Allergene eine sichere und effektive SIT etabliert ist. Die SIT kann auch in mancher Hinsicht als prophylaktische Therapie betrachtet werden, da sie einer Ausweitung der Sensibilisierung entgegenwirkt und einen sogenannten Etagenwechsel verhindert. Unter einem Etagenwechsel versteht man das Übergreifen der Sensibilisierung vom Hals-Rachenraum (Heuschnupfen) in die Bronchien (Asthma) (Jacobsen, 2001; Möller et al., 2002).

Der Wirkmechanismus der SIT ist noch nicht genau geklärt. Als Hauptwirkmechanismus wird allerdings die Beeinflussung der T-Helferantwort zugunsten der Th1-Antwort und die entsprechende Verschiebung der Zytokine mit einem Abfall von IL-4 und einem Anstieg von IFN- $\gamma$  angesehen. Dadurch soll es auch zu einer Verringerung der IgE- und IgE-Rezeptor-Synthese kommen.

Erfolgreiche SIT führt auch zur Induktion der peripheren Toleranz in T-Zellen durch die Generierung von T-Regulator-Zellen, welche die suppressiven Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  sezernieren (Akdis et al., 1998; Jutel et al., 2003). IL-10 führt neben der Toleranzentstehung in T-Zellen auch zur Bildung allergenspezifischer IgG<sub>4</sub>-Antikörper und Hemmung der IgE-Synthese (Akdis et al., 2004).

Neben der Erweiterung des Allergenspektrums und anderen Applikationsformen werden auch die zu verabreichenden Extrakte ständig weiterentwickelt. So soll die allergenspezifische Immuntherapie durch neue Adjuvanzen effektiver werden. Neuere Adjuvanzen umfassen die TLR-Liganden Monophosphoryl- Lipid A (MPLA) sowie in Erprobung bakterielle Oligonukleotide (z.B. CpG- Sequenzen).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

In der Literatur werden Toll-like-Rezeptor Agonisten als Immunomodulatoren beschrieben, die die Immunantwort in Richtung eines Th1-Phänotyps beeinflussen können. In der Therapie der Typ I Allergien werden deshalb Allergene mit TLR-Liganden kombiniert (Mothes et al., 2003; Vollmer, 2005; Puggioni et al., 2005). Die TLR-Ligand/ Allergen Impfstrategie beruht auf dem gleichzeitigen Erkennen des jeweiligen Allergens zusammen mit dem TLR-Ligand, wodurch es zur Bildung von Th1-Zytokinen während der Allergenverarbeitung kommt. Dadurch wird einer Th2-orientierten Immunantwort entgegen gewirkt.

Es ist weiterhin bekannt, dass dendritische Zellen in dieser durch SIT hervorgerufenen Immunantwort eine entscheidende Rolle spielen. Ein bestimmter Subtyp der DCs, die myeloiden DCs, exprimiert eine grosse Spannbreite von TLRs (TLR1,2,3,4,5,6,8,10) und produziert proinflammatorische Zytokine wie IL-12 and TNF- $\alpha$ . Insbesondere IL-12 lenkt die Immunantwort in Richtung eines Th1-Phänotyps (Gangloff und Gouenounou, 2004).

Zielsetzung dieser Arbeit war, die Reaktionsmuster von mDCs hochatopischer Individuen mit mDCs von gesunden Spendern auf TLR-Liganden zu vergleichen. Die meisten der Patienten, welche sich für ein SIT-Protokoll qualifizieren, haben eine atopische Disposition.

Zunächst sollten hoch aufgereinigte mDCs von atopischen und gesunden Individuen auf ihre TLR-Expression durch quantitative Real Time PCR untersucht werden.

Bakterielle DNA-Sequenzen mit den typischen CpG-Motiven, welche an TLR9 binden und auch Monophosphoryl-lipid-A, der aktive, an TLR4 bindende Teil von LPS, werden bereits in kommerziell erhältlichen SIT-Produkten verwendet (Francis und Durham, 2004; Mothes et al., 2003). In dieser Arbeit wurden weitere Liganden untersucht. So wurden die Zellen mit den Liganden Peptidoglycan (TLR2), Poly IC (TLR3), LPS (TLR4), and Flagellin (TLR5) stimuliert. Als Kontrolle waren CpG und Non-CpG-DNA vorgesehen, Liganden für TLR9, ein Rezeptor, welcher nicht von mDCs exprimiert wird. Die DC Aktivierung sollte analysiert werden durch die Expression verschiedener Oberflächenmarker und der Produktion von IL-12 und TNF- $\alpha$ .

In der Literatur sind Assoziationen zwischen Atopie und verschiedenen single nucleotide polymorphisms innerhalb von TLR-Genen beschrieben.

Zur Erforschung einer möglicherweise zugrunde liegenden genetischen Komponente sollten alle Probanden weiterhin für SNPs innerhalb der TLR 2-, 3-, und 4-Sequenzen untersucht werden.

### 3 Probanden, Material und Methoden

#### 3.1 Probanden

##### 3.1.1 Patienten mit atopischer Disposition

Eine Gruppe von acht Atopikern wurde aus dem Klientel der Atopiesprechstunde der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München rekrutiert. Sie bestand aus Patienten mit atopischem Ekzem (AE), die die Diagnosekriterien für atopische Dermatitis nach Hanifin und Rajka (Hanifin und Rajka, 1980) erfüllten (Tab. 3.1; Tab. 3.2). Zum Teil litten die Patienten auch an weiteren Erkrankungen des atopischen Formenkreises, an Rhinoconjunktivitis allergica (RCA), allergischem Asthma bronchiale (AB) oder einer klinisch relevanten Nahrungsmittelallergie. Bei allen Patienten war das Gesamt-IgE deutlich erhöht und lag über 1000 IU/ml. Das Gesamt-IgE wurde mit Immulite 2000 der Firma DPC Biermann bestimmt.

**Tabelle 3.1: Zusammenstellung der untersuchten atopischen Patienten**

Proband	Geschlecht, Alter	Gesamt- IgE (IU/ml)	Diagnosen
1, RW	M, 44	8529	AE, RCA
2, IB	F, 60	7533	AE, RCA
3, HK	M, 38	4135	AE, RCA, AB
4, JM	F, 27	4294	AE
5, FH	M, 35	9982	AE, AB
6, FPD	M, 44	18935	AE, klinisch relevante Nahrungsmittelallergie
7, JW	F, 22	1018	AE
8, GR	M, 66	5724	AE

**Tabelle 3.2: Anamnese der Atopiker**

Proband	Anamnese (Erkrankungsbeginn, Verlauf, Zustand bei Blutuntersuchung)
1, RW	AE seit Kindheit. Aktuell: im Gesicht-/Halsbereich massiv erythematöse, teils lamellär schuppene, stark juckende Veränderungen; im Bereich der großen Beugen schuppene Erytheme mit Exkoriationen
2, IB	AE seit 43. Lj. Seit einigen Jahren zunehmende Verschlechterung mit ineinander übergehenden Schüben ohne vollständige Abheilung. Aktuell: Erythrodermie, Alopezie bei prolongiertem, exazerbiertem atopischen Ekzem

3, HK	AE seit 27. Lj. Aktuell: an Armen, Gesicht, Nacken, Oberkörper und Kniekehle stark juckende, lichenifizierte Erytheme mit fein lamellärer Schuppung
4, JM	AE seit Kindheit. Seit 5 Jahren unverändert stationärer Verlauf
5, FH	AE seit Pubertät. Aktuell: an Extremitäten unter Betonung der Hand- und Fußrücken dyshidrosiforme Bläschen, vielfach konfluierend, weiterhin prurigiforme Knoten mit Erosionen und krustig- gelblichen Belägen
6, FPD	AE seit Kindheit. Wechselnder Verlauf. Aktuell: akut exazerbiertes, superinfiziertes AE, am gesamten Integument, extremitätenbetont, stark infiltrierte, teils schuppene, teils krustig belegte Erytheme, z. T. mit Erosionen
7, JW	AE seit Pubertät. Aktuell: ausgeprägte ekzemartige Veränderungen im Gesichts- und Oberkörperbereich. Multiple erythematös infiltrierte, z.T. rhagadiforme Infiltrationen mit pustulöser, z.T. gelbkrustiger Auflage
8, GR	AE seit 52. Lj., seit 2 Jahren stete Verschlechterung und Ausbreitung. 3 Tage vor Blutabnahme akute Exazerbation.

Die Patienten wiesen außerdem IgE-vermittelte Sensibilisierungen gegen Aeroallergene und/oder Nahrungsmittelallergene auf (Tab. 3.3).

Die spezifische IgE-Bestimmung wurde bei den Patienten 1-5 mit Immulite 2000-Allergie (DPC) durchgeführt. Bei Testung des Standard-Allergenspektrums fanden sich Reaktionen der CAP-Klassen 1-6. Reaktionen der CAP-Klasse 6 sind als sehr stark positive Reaktionen, Reaktionen der CAP-Klasse 0 als negativ einzustufen. Bei den Patienten 6-8 wurde die spezifische IgE-Bestimmung mit CLA Atopy 20L RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test) durchgeführt, deren Reaktionen in 4 Klassen eingeteilt werden, von 4 stark positiv bis 0 negativ.

**Tabelle 3.3: Spezifische Sensibilisierungen der Atopiker**

Proband	Spezifische Sensibilisierungen auf Standardtests	
1, GR	Klasse 6:	Dermatophagoides pteronyssius (Derm. Pteron.)
2, IB	Klasse 1:	Milcheiweiß
	Klasse 2:	Hühnereiweiß, Weizen, Lieschgras
	Klasse 3:	Derm. pteron., Sellerie
	Klasse 5:	Dorsch, Beifuss
	Klasse 6:	Katzenepithelien, Warzenbirke
3, HK	Klasse 1:	Hühnereiweiß
	Klasse 2:	Sellerie, Latex, Paprika, Mandel, Pistazie, Kokos-, Cashew-, Walnuss, Sojabohne
	Klasse 3:	Katzenepithelien, Weizenmehl, Tomate, Haselnuss,

		Roggenmehl, Gerstenmehl, Erdnuss, Hafermehl, Maismehl, Reis, Sesamschrot
	Klasse 4:	Beifuss (Pollen)
	Klasse 5:	Derm. pteron.
	Klasse 6:	Lieschgras (Pollen), Birke (Pollen)
4, JM	Klasse 1:	Milcheiweiß
	Klasse 2:	Hühnereiweiß, Weizen, Lieschgras
	Klasse 3:	Derm. pteron., Sellerie
	Klasse 4:	Beifuss
	Klasse 5:	Dorsch
	Klasse 6:	Katzenepithelien, Warzenbirke
5, FH	Klasse 1:	Hühnereiweiß
	Klasse 2:	Beifuss, Weizenmehl, Latex
	Klasse 4:	Katzenepithelien
	Klasse 5:	Birke
	Klasse 6:	Derm. pteron., Lieschgras
6, FPD	Auf alle getesteten Allergene sehr stark positive Reaktionen.	
7, JW	Klasse 1:	Lieschgras, Birkenpollen, Milch, Weizenmehl
8, RW	Klasse 1:	Katzen-, Pferdeepithelien, Haselpollen, Kabeljau, Dorsch, Erdnuss, Eiklar
	Klasse 2:	Hundepithelien, Birkenpollen, Milcheiweiß
	Klasse 4:	Derm. pteron., Lieschgras, Aspergillus spec., Cladosporium

### 3.1.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe – die „Nicht-Atopiker“ - wurde aus gesunden Medizinstudenten rekrutiert. Voraussetzung war das anamnestische Fehlen von allergischen Symptomen und Unverträglichkeitsreaktionen aller Art, sowie das Fehlen einer Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis (atopische Dermatitis, allergische Rhinitis und Konjunktivitis, Asthma bronchiale, Nahrungsmittelallergie). Das Gesamt-IgE aller Nicht-Atopiker lag unter 70 IU/ml (Tab. 3.4).

**Tabelle 3.4: Zusammenstellung der Kontrollgruppe**

Proband	Geschlecht, Alter	Gesamt-IgE (IU/ml)
9, DT	W, 24	21,7
10, DS	W, 28	32,5
11, SM	M, 25	21,1

12, JL	W, 25	68,6
13, JG	W, 26	22,9

## 3.2 Material

### 3.2.1 Zellkulturmaterial

BSA (Albumin) Fract. V > 96% pulv.	Roth, Karlsruhe, D
EDTA 0,5mM, pH 8,0	Gibco, Invitrogen, UK
FBS (Foetal Bovine Serum), (20min bei 56°C hitzeinaktiviert)	High Clone Perbio Science, Erembodegem, Belgien
Gentamycin (10mg/ml)	Gibco, Invitrogen, UK
Glutamin 200mM	Gibco, Invitrogen, UK
GM-CSF (Gebrauchskonz. 5000IU/ml)	AL-ImmunoTools, Friesoythe, D
HBSS	Gibco, Invitrogen, UK
Mouse anti Human IgG (1mg/ml)	Invitrogen, UK
IL-4 (Gebrauchskonz. 5000IU/ml)	AL-ImmunoTools, Friesoythe, D
Lymphozytentrennmedium LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
2-Mercaptoethanol, 50mM, 20ml	Gibco, Invitrogen, UK
PBS	Gibco, Invitrogen, UK
RPMI 1640 Medium	Gibco, Invitrogen, UK
Trizol® Reagent	Invitrogen, UK
Tween 20	Sigma, St. Louis, USA

### 3.2.2 Standardpuffer und Medien

CD1a-Lösung: 100µl MACS-Puffer, 23 µl CD1a-PE-Ak

Elisa-Waschpuffer: PBS, 0,05% Tween 20

FACS-Puffer: PBS/1%FCS

FI-Medium:

475ml	RPMI
25ml	FBS hitzeinaktiviert
1ml	Gentamycin
5ml	Glutamin
500µl	50mM Mercaptoethanol

### HU-Dc-medium:

450ml	RPMI
50ml	FBS hitzeinaktiviert
1ml	Gentamycin
5ml	Glutamin
500µl	50mM Mercaptoethanol
500 µl	GM-CSF
500 µl	IL4

### IgG-Lösung:

PBS-Protein 1,7ml  
IgG (1mg/ml) 300µl

### MACS-Puffer:

PBS, 0,5%BSA, EDTA 2mM

### MACS-Beads Lösung:

80µl MACS-Puffer, 20µl MACS-Beads

### PBS/EDTA:

5ml EDTA 0,5M auf 1 Flasche PBS (500ml)

### PBS-Protein:

PBS, 1%BSA 2,7ml  
FBS 300µl

## 3.2.3 TLR-Agonisten

Tabelle 3.5: TLR-Agonisten

TLR-Agonist	TLR	Eingesetzte Endkonzentration	Bezugsquelle
PGN	TLR 2	10µg/ml	InvivoGen, San Diego, USA
Pam3Cys	TLR 2	5µg/ml	InvivoGen
Poly IC	TLR 3	2µg/ml	SIGMA, St Louis, USA
LPS	TLR 4	1µg/ml	InvivoGen
S. Typhimurium Flagellin	TLR 5	2µg/ml	InvivoGen
CpG, ODN 2006	TLR9	0,5nM	InvivoGen
Non CpG, ODN 2006	Kontrolle für TLR9	0,5nM	InvivoGen

## 3.2.4 Antikörper

Tabelle 3.6: Antikörper

Antigen	Konjugat	Isotyp	Bezugsquelle
CCR3	PE	Isotyp Rat IgG <sub>2A</sub>	R&D Systems, Minneapolis, USA



## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Generierung dendritischer Zellen (DCs)

Die Gewinnung von DCs aus peripherem Blut wurde schon vielfach beschrieben (unter anderem Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Romani et al., 1994; Chapuis et al., 1997). Für die Versuche dieser Arbeit erfolgte sie nach dem hier beschriebenen Protokoll.

#### 3.3.1.1 Allgemeine Arbeitstechniken mit Zellen

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden unter Normalbedingungen, d.h. bei 5% CO<sub>2</sub>, wassergesättigter Atmosphäre und 37°C kultiviert. Die Aufbewahrung lebender Zellen während der Versuchsdurchführung erfolgte immer bei 4°C auf Eis. Die Zentrifugationsschritte wurden ebenfalls immer bei 4°C für 5min bei 1300rpm durchgeführt.

Um die genaue Zellzahl zu bestimmen, wurde das Zellpellet der zu bestimmenden Zellpopulation in 1ml PBS aufgenommen. 10µl der Zellsuspension wurde mit 90µl PBS vermischt und 10µl dieser 1:10 Verdünnung mit Hilfe einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Durch Multiplikation der Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor (hier 10) und dem Umwandlungsfaktor (10<sup>4</sup>) für die Neubauerzählkammer wird die gesamte Zellzahl berechnet.

$$\text{Zellzahl} \times 10 \times 10^4 = \text{Zellen insgesamt}$$

#### 3.3.1.2 Isolieren von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs)

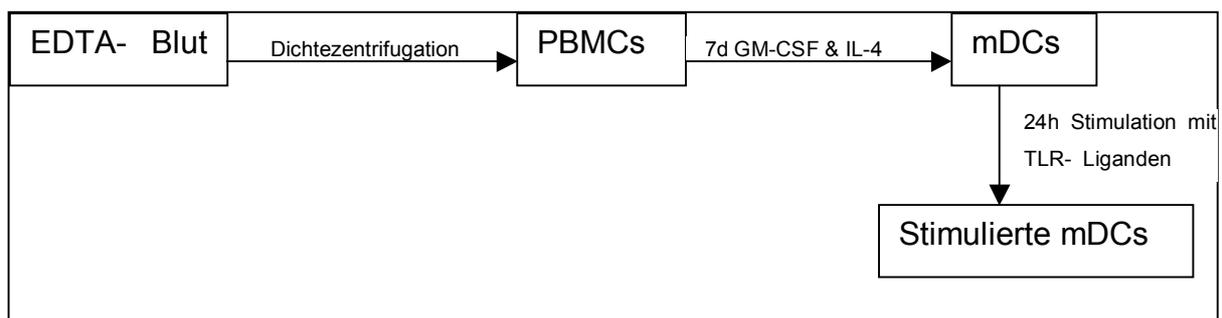
Die Generierung der mDCs (Monocyte- derived dendritic cells) erfolgte aus peripherem EDTA- Blut nach dem in der Abbildung 3.1 beschriebenen Protokoll.

Für die Gewinnung der dendritischen Zellen wurde von einem Probanden 36ml venöses EDTA-Blut abgenommen. Das EDTA-Blut wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. Anschließend wurden 7ml vorgelegtes Lymphozytentrennmedium Ficoll 1077 im 15ml Falcon Röhrchen vorsichtig mit 7ml des verdünnten Blutes überschichtet und 40min lang bei 2000rpm zentrifugiert.

Die mononukleären Zellen wurden aufgrund der Zentrifugalkräfte in der weißlich erscheinenden Phase zwischen Plasma und Ficoll zurückgehalten, während

Erythrozyten und Granulozyten durch die Ficollschicht diffundierten und das Pellet bildeten. Die leichten Thrombozyten verblieben in der Plasmaphase.

Die Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellen anschließend drei mal mit PBS 5mM EDTA gewaschen. Das EDTA wurde hinzugefügt, um die Zelladhäsion an die Kunststoffröhrchen zu minimieren. Anschließend wurde die Zellzahl der gewonnenen PBMCs bestimmt. Aus 36ml venösem EDTA- Blut wurden durchschnittlich 240 - 400 x 10<sup>6</sup> PBMCs gewonnen.



**Abbildung 3.1**

**Generierung von mDCs.** PBMCs wurden aus EDTA- Blut durch Dichtezentrifugation gewonnen, und anschließend für 7 Tage mit GM-CSF und IL-4 in Kultur genommen. Die Aktivierung der unreifen, unstimulierten mDCs erfolgte durch Zugabe von TLR-Liganden für 24 h.

### **3.3.1.3 Differenzierung von dendritischen Zellen**

In eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 10ml vorgewärmten FI-Medium wurden 60- 100 x 10<sup>6</sup> PBMCs ausgesät und anschließend 1-3h zum adhären Wachsen im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhären Zellen vier mal mild mit vorgewärmtem HBSS gewaschen. Auf die verbliebenen adhären Monozyten wurde 15ml HU-DC Medium aufpipettiert.

Am 3. und 5.Tag in Kultur wurde die Hälfte des Mediums, 7,5ml, abpipettiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in derselben Menge neuen Mediums mit der doppelten Konzentration an Zytokinen, IL-4 und GM-CSF, aufgenommen. IL-4 (Interleukin 4) und GM-CSF (Granulocyte-makrophage colony-stimulating factor) stimulierten die Differenzierung unreifer dendritischer Zellen aus Monozyten.

### **3.3.1.4 Stimulation der dendritischen Zellen**

Am 7.Tag wurden die Zellen abschließend im Auflichtmikroskop in den Gewebekulturflaschen morphologisch beurteilt und aus den Flaschen geerntet. Sie wurden gewaschen, gezählt und dann, in FI-Medium aufgenommen, gleichmäßig in 7

Wells einer 24-Well Platte verteilt. In einem Gesamtvolumen von 1ml pro Well inkubierten die Zellen 24h im Brutschrank mit den TLR-Agonisten bzw. Kontrollen in den unter 3.2.3 angegebenen Konzentrationen.

In der Regel konnten am 7.Tag 5- 6 Mio unreife mDCs gezählt werden. Es konnten also im arithmetischen Mittel  $1,7 \% \pm 0,6\%$  mDCs aus den PBMCs gewonnen werden. Die Zellen wurden an den Tagen des Mediumaustauschs, am Tag der Ernte und nach der Stimulation gezählt. Unter Berücksichtigung des Zellverlustes bei dem zweimaligen Mediumaustausch und dem Ernten der Zellen aus den Gewebekulturflaschen, waren die Zellzahlen der dendritischen Zellen während und nach Kultur und Stimulation konstant. Dies war unabhängig davon, mit welcher Substanz die Zellen in der Kultur stimuliert worden waren. Die dendritischen Zellen aus peripherem Blut proliferieren also in den verwendeten Reagenzien in Kultur nicht, auch wenn sie mit endogenen (GM-CSF, IL-4) oder exogenen Mediatoren (z.B. LPS) stimuliert werden.

Die Morphologie und Vitalität der Zellen wurde kontinuierlich im Auflichtmikroskop beobachtet. Nach zwei Tagen Inkubation mit GM-CSF und IL-4 zeigten die homogenen, runden Zellen teilweise über die Oberfläche verteilte, multiple, kleine zytoplasmatische dendritische Zellausläufer, welche ein Drittel des Zelldurchmessers nicht übertrafen. Ein kleiner Teil der Zellen zeigte größere Ausläufer. Als Zeichen der Vitalität hatte eine Migration der meisten Zellen zu Zellhaufen stattgefunden. Bei der zusätzlichen Stimulation mit exogenen Faktoren wie LPS und Poly IC vermehrte sich sowohl der Anteil der Zellen mit dendritischen Zellausläufern als auch die Größe der Ausläufer.

Die Tage des teilweisen Mediumaustausches mit Hinzufügen von GM-CSF und IL-4 variierten. Der Austausch fand wahlweise an Tag 3 und 6, an Tag 4 und 6 oder an Tag 3 und 5 statt. Diese unterschiedlichen Rhythmen hatten keine Auswirkung auf die Zahl und Art der gewonnenen Zellen.

Die dendritischen Zellen wurden anschließend phänotypisch durch die Durchfluß-Zytometrie Analyse charakterisiert. Die Überstände aus diesen Inkubationen wurden mithilfe von ELISA-Assays untersucht.

## **3.3.2 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)**

### **3.3.2.1 Prinzip**

Mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse ist es möglich, Zellen genauer zu charakterisieren und ihre quantitative Expression von Oberflächenmolekülen zu analysieren.

Grundlage ist die Antigen-Antikörper Reaktion, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. In dieser Arbeit verwendete Farbstoffe waren FITC (Fluorescein Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und Cychrome.

Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch eine feine Kapillare gedrückt und an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Die Farbstoffmoleküle der Antikörper werden bei exakter Anregung durch den monochromatischen Laserstrahl zur Fluoreszenz gebracht. Das emittierte Licht, das durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern auf der Zelle.

Die verwendeten Farbstoffe werden zwar bei einer gleichen Wellenlänge angeregt, jedoch verfügen sie über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren, so dass gleichzeitig mehrere FACS-Messungen durchgeführt werden können.

Informationen über die Zellgröße (in der Forward Scatter Collection (FSC)) und die Binnenstruktur, wie die Granularität des Zytoplasmas oder die Größe des Zellkerns (in der Side Scatter Collection (SSC)), werden durch die Lichtbeugung und Lichtstreuung des Laserstrahls gewonnen.

Über Dotplot- Darstellungen lassen sich dann verschiedene Populationen einer Zellsuspension unterscheiden, die über die gemessene Fluoreszenzintensität bezüglich ihrer Menge und Art der exprimierten Oberflächenmoleküle weiter charakterisiert werden können.

### **3.3.2.2 Färben der Zellen und Messung**

Je Färbung wurden zwischen  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$ , mit PBS gewaschene Zellen der zu testenden Zellsuspension eingesetzt. Diese wurden in einem Volumen von 50  $\mu$ l FACS- Puffer mit den jeweiligen Antikörpern in geeigneter Konzentration und Kombination für 30min inkubiert. Um eine photochemische Inaktivierung der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden, wurde die Inkubation im Dunkeln und auf Eis

durchgeführt. Die nicht direkt markierten monoklonalen Antikörper wurden in einem zweiten Schritt durch Fluoreszenzfarbstoff markierte Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Inkubationsbedingungen bei diesem FITC markierten Ziege-Anti-Maus monoklonalen Antikörper waren die gleichen wie bei den Primärantikörpern.

Zur Kontrolle der Hintergrundfärbung und Kompensation wurden parallel zu jedem Ansatz entsprechende Isotypenkontrollantikörper mitgeführt, CD1a FITC, CD1a PE und CD1a Cychrome.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden die markierten Zellen zur Analyse in 350µl FACS-Puffer aufgenommen.

Alle Analysen wurden auf einem Dreikanalgerät (FACS-Star) oder einem Vierkanalgerät (FACSCAlibur) der Fa. Becton Dickinson, New Jersey, USA bzw. Heidelberg, durchgeführt und mittels der empfohlenen Software (CellQuest) ausgewertet.

Die individuellen Einstellungen wurden mit Hilfe der ungefärbten Negativkontrolle und mit Kontrollen für die einzelnen Farbstoffe durchgeführt. Die Kompensationen für den Laserstrahl des Facs- Gerätes wurden so eingestellt, dass die ungefärbte Negativkontrolle tatsächlich als ungefärbt erschien und die Kontrollen für die einzelnen Farbstoffe nur Signale des jeweils gefärbten Farbstoffes aussendeten.

Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass bei den mehrfach gefärbten Proben die Zahl doppelpositiver Zellen aussagekräftig ist. Quadranten wurden gesetzt, um die einzelnen Populationen zu quantifizieren. Die prozentualen Anteile der Zellpopulationen in den einzelnen Quadranten sind jeweils angegeben.

Zur Charakterisierung der unstimulierten Zellen atopischer und nicht- atopischer Spender wurden für jede Präparation einen Tag nach der Zellernte, an Tag 8, durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die Zellen wurden ungefärbt und nach Inkubation mit Antikörpern in verschiedenen Kombinationen (Tab. 4.1) mit dem FACS- Gerät untersucht. Die Antikörper waren an die Farbstoffe FITC (Fluorescein Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin) und Cychrome gekoppelt.

**Tabelle 3.7: untersuchte Antikörper- Kombinationen bei den verschiedenen Proben**

<b>Probe / Bild in Abb.4.2</b>	<b>FITC- gekoppelt</b>	<b>PE- gekoppelt</b>	<b>Cychrome- gekoppelt</b>
1/ B,C	FceRI	MHCI	CD1a
2/ D,E	CXCR4	CCR3	CD1a
3/ F,G	HLA-DR	Mannose- Rezeptor	CD1a

4/ H	-	CD40	CD1a
5/ I	-	CD80	CD1a
6/ J	-	CD83	CD1a
7/ K	-	CD86	CD1a

### 3.3.3 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

#### 3.3.3.1 Prinzip

Der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) ist durch seine hohe Sensitivität dazu geeignet, die geringen Mengen Zytokin (im Pikogramm-Bereich) im Zellkulturüberstand quantitativ nachzuweisen. Dabei reagiert das zu messende Zytokin in einer Antigen-Antikörper-Reaktion als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (*capture antibody*), der an einer Mikrotiterplatte anheftet.

Ein hinzugegebener, enzymgekoppelter Sekundärantikörper (*detection antibody*) bindet ebenfalls an das Zytokin und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Zytokinkonzentration und kann photometrisch bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen wird die absolute Konzentration ermittelt.

#### 3.3.3.2 IL-12 und TNF- $\alpha$ ELISAs

Für die Analyse der Zytokinkonzentration von Zellkulturüberständen wurden kommerziell erhältliche ELISA-Testsysteme verwendet. Der Zellkulturüberstand wurde sowohl unverdünnt als auch in einer 1:10 Verdünnung in die Vertiefungen einer 96-Loch Platte (NUNC Maxisorp, NUNC Immunoplatte) gegeben, deren Boden zuvor mit einem für das jeweilige Zytokin spezifischen Antikörper überzogen worden ist. Als nächstes wurde das Zytokin mit einem spezifischen biotinylierten Sekundärantikörper markiert. An das Biotin wurde zusätzlich zur Signalverstärkung Streptavidin-gekoppelte „horse-raddishperoxidase“ (HRP) gebunden. Bei Zugabe des HRP-Reaktionssubstrats (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kam es durch enzymatischen Umbau zu einer Farbreaktion. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Für jeden Zytokinnachweis wurde eine Referenzstandardreihe erstellt (Tab. 3.7). Sowohl die Standards als auch die einzelnen Proben und ihre Verdünnungen wurden als Duplikate angefertigt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450nm durch ein Photo- Spektrometer gemessen. Der Elisareader konnte durch Vergleich mit den Referenzstandards die Zytokinkonzentration bestimmen. Aus den Duplikaten wurden

die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung ermittelt, wodurch eine graphische Darstellung möglich war.

**Tabelle 3.8: beispielhafte Referenzstandards**

Zytokine	Extinktionen							
IL-12	0,029	0,046	0,085	0,165	0,331	0,632	1,229	2,321
TNF- $\alpha$	0,047	0,079	0,135	0,245	0,500	0,978	1,772	3,097

### 3.3.4 Magnetic Associated Cell Sorting (MACS)

#### 3.3.4.1 Prinzip

Für die magnetische Zellsortierung (MACS) werden Antikörper verwendet, die paramagnetische Eigenschaften haben. Sie können entweder spezifisch an die Zelloberfläche binden oder als Sekundärantikörper an bereits gebundene Antikörper. Lässt man die inkubierten Zellen durch eine mit Stahlwolle gefüllte Säule laufen, welche sich in einem permanenten, stark magnetischen Feld befindet, so werden die spezifisch markierten Zellen in der Säule zurückgehalten. Entfernt man die Säule aus dem magnetischen Feld können die magnetisch zurückgehaltenen Zellen als positiv selektierte Zellfraktion herausgewaschen werden.

Durch die kleine Größe der paramagnetischen Antikörper (50nm Durchmesser) wird die Lichtbrechung im Durchflusszytometer laut Herstellerangabe nicht beeinflusst.

#### 3.3.4.2 Isolierung der CD1a+ Zellen

Die dendritischen Zellen wurden am achten Tag geerntet, gezählt und in IgG- Lösung zur Blockade unspezifischer Bindungen 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in CD1a- PE Lösung inkubiert. Nachdem die nichtgebundenen CD1a- Antikörper durch zwei weitere Waschschriffe entfernt wurden, wurden die Zellen mit den Anti-PE MicroBeads inkubiert. Die magnetischen MicroBeads sind an monoklonale Antikörper gegen den Farbstoff Phycoerythrin (PE) gebunden und binden somit an das PE des CD1a- Antikörpers, der an die Zellen gebunden hat. Die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen, um die nicht gebundenen MicroBeads zu entfernen.

Der gesamte Versuch wurde schnell, auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt, um eine nicht spezifische Zellmarkierung zu verhindern. Die LS-Säulen wurden in das magnetische Feld des QuadroMACS Separators platziert und

nach Herstellerangabe vor der Sortierung mit Puffer befeuchtet. Dann wurden die Zellen in 500µl MACS- Puffer auf die Säule aufgetragen und anschließend wurden die nicht magnetisch gebundenen Zellen mit 5 x 5ml MACS- Puffer herausgespült. Nach Entfernen der Säule aus dem Magneten wurden die magnetisch markierten Zellen aus der Säule gelöst, abermals auf eine frische, vorbereitete Säule im magnetischen Feld gegeben und der Vorgang wiederholt, um eine noch größere Reinheit zu erlangen. Zur durchflusszytometrischen Reinheitskontrolle wurden fünfmal im Prozedere  $10^5$  Zellen entnommen. Die erste Probe wurde aus den frisch geernteten Zellen vor der Sortierung entnommen, dann wurden die ausgewaschenen Zellen und die positiv selektierten Zellen untersucht. Auch von dem zweiten Separationsvorgang wurden ausgewaschene Zellen untersucht und positiv selektierte Zellen.

Die Quantifizierung der dendritischen Zellen im FACS- Scan erfolgte einmal mit Hilfe des CD1a-Markers und dann nach ihrer Größe und Granularität.

### **3.3.5 RNA- Präparation**

Um RNA aus den Zellen zu gewinnen, wurden  $0,7 - 2,5 \times 10^6$  Zellen in 1ml Trizol aufgenommen und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Das im Trizol enthaltene Guanidiumthiocyanat löst die Zellmembran auf und denaturiert alle Proteine und auch RNAsen, ohne aber die RNA zu gefährden.

Bei allen Extraktions- und Fällungsschritten wurde stets unter streng RNase- freien Bedingungen und auf Eis (sofern nicht anders vermerkt) gearbeitet.

Die mit Trizol behandelten Zelllysate wurden nach dem Auftauen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und anschließend für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben 10min bei 13000rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und die wässrige Phase schließlich in ein neues sauberes Tube überführt.

Bei der folgenden Phasenpräparation wurde jeweils 250µl Chloroform (Fa. Merck) hinzugegeben, die Probe mit Hand für 30sec gut gemischt und bei Raumtemperatur 2-3min inkubiert. Zwischenzeitlich wurde ebenfalls regelmäßig gemischt. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 13000rpm für 10min bei  $4^\circ\text{C}$  bildeten sich 2 deutliche Phasen, eine RNA- haltige, wässrige Phase über einer DNA- haltigen Phenol- Phase, welche durch eine Proteinbande getrennt waren.

Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgehoben und die RNA durch die Zugabe von 500µl Isopropanol (Fa. Merck) gefällt. Nach 10-minütiger Inkubation bei

Raumtemperatur wurde bei 13000rpm und 4°C für 15min zentrifugiert und das Pellet in 1ml eisgekühltem 75%igen Ethanol (Fa. Merck) gewaschen, um verbliebene Salze zu entfernen.

Für die weiteren Schritte wurde das RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, D) verwendet. Das Pellet wurde mit 350µl RLT Puffer aufgemischt. Dieser Puffer ist hoch denaturierend und enthält Guanidinisothiocyanat. Eventuell noch vorhandene RNasen wurden so inaktiviert und die Probe homogenisiert. Anschließend wurde 250µl EtOH 99,99% hinzugefügt, um gute Bindungskonditionen zu schaffen. Dann wurde die Probe auf eine RNeasy Säule aufgetragen. Alle RNA, die größer als 200 Basenpaare ist, band sich nun an die Silikon- Gel Membran. Es wurde also nur mRNA gebunden, die 80-85% der gesamten RNA-Menge ausmacht. Es folgten fünf Waschschrte mit RW1 (enthält Guanidinhydrochlorid) und RPE (enthält Ethanol) Puffern, um Verunreinigungen wegzuwaschen. Daraufhin wurde die RNeasy Säule auf ein neues 1,5 Tube transferiert und die RNA mit 25-40µl RNase- freies Wasser, welches direkt auf die RNeasy silica- gel Membran pipettiert wurde, eluiert.

Die gewonnene RNA wurde photometrisch (Pharmacia Gene Quant) bei 260/280 nm gemessen und die Konzentration nach folgender Formel errechnet:

$$K = OD \times V \times F$$

K= RNA-Konzentration

OD= optische Dichte bei 260/280nm

V= Verdünnungsfaktor

F= Faktor (bei RNA muss der Faktor 40 eingesetzt werden, da eine optische Dichteeinheit 40µg/ml entspricht)

Abschließend wurde die RNA, in dem Wasser gelöst, bei -80°C weggefroren.

### 3.3.6 cDNA- Synthese

Nun wurde die gewonnene Gesamt- RNA zunächst in cDNA umgeschrieben, um für die darauf folgende PCR eingesetzt werden zu können. Dies erfolgte mit dem „SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Karlsruhe, D) Hierbei wird selektiv nur die mRNA der eingesetzten RNA erkannt und umgeschrieben. Stränge der mRNA unterscheiden sich von anderen RNA-Formen (rRNA der Ribosomen, tRNA Transfer-RNA zur Übertragung von Aminosäuren) durch ein Ende mit mehreren Adenin-Basen (Poly-A-Sequenz). Diese Selektion erfolgte mit Hilfe von Primern aus Thymidin-Basen (Oligo(dT)<sub>12-18</sub>), welche in einem

Initiationsschritt der cDNA-Synthese durch die spezifische Basenpaarung nach Watson und Crick (Watson und Crick, 1953) an die Poly-A-Schwänze der mRNAs hybridisieren. Hier bildete sich so eine doppelsträngige Ansatzstelle für das Enzym SuperScript RT (Reverse Transkriptase). Dieses verknüpfte die anschließend hinzu gegebenen Desoxy-Nukleotide zu einem der mRNA komplementären Strang. RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor wurde dem Reaktionsgemisch zugegeben, um die mRNA zu schützen und den totalen cDNA Ertrag inklusive dem Anteil der totalen Länge von cDNA zu verbessern. Alle Reaktionsschritte erfolgten in einem PCR-Cycler von MWG Biotech, Ebersberg.

1,5µg RNA, 2µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (0,5µg/µl) und 2µl dNTP (10mM) wurden mit sterilem, destilliertem Wasser auf ein Volumen von 24µl für jeden Reaktionsansatz pro Probe aufgefüllt.

Dieser Reaktionsansatz wurde zunächst einem Heißstart für 5min bei 60°C unterzogen, um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren und die Anbindung der Primer zu fördern. Danach erfolgte die Inkubation auf Eis für 1min.

Nun wurden 8µl 5X First-Strand Puffer, 4µl 0,1M DTT und 2µl RNaseOut zu jedem RNA/Primer – Ansatz gegeben, gut gemischt und bei 42°C für 5min inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz von insgesamt jeweils 38µl komplementiert durch Zugabe von je 2µl SuperscriptII RT und für 50min bei 42°C inkubiert. In einem letzten Schritt erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 15min. Als Qualitätskontrolle wurden Proben ohne Zusetzung der Reversen Transkriptase (-SS) und ohne RNA (NTC- No template Control) mitgeführt. Die fertig synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **3.3.7 Polymerase chain reaction (PCR)**

Die PCR ist eine Methode, um ein bestimmtes DNA-Segment in vitro exponentiell zu amplifizieren. Die Amplifikation wird katalysiert durch eine hitzestabile DNA-abhängige Polymerase (z.B. Taq-Polymerase). Die Polymerase benötigt als Starthilfe Oligonukleotide („Primer“), die an bekannte Sequenzbereiche des „sense“- und „antisense“- Stranges des DNA-Segmentes binden. Die Amplifikation der DNA verläuft nur zwischen den beiden Primern, auf diese Weise können gezielt bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden.

Die DNA wird bei Temperaturen von 95°C in einzelsträngige Moleküle denaturiert, gefolgt von der Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die spezifische Region der

Matrize bei einer dafür kalkulierten Annaelngtemperatur (gewöhnlich zwischen 40-60°C) und einer anschließenden DNA-Synthese bei ca. 70°C durch die hitzestabile Taq-Polymerase (Elongation).

### **3.3.7.1 Real Time PCR**

Die Taqman PCR Methode ist eine hochsensitive Methode, um die cDNA von Interesse in einer gegebenen Probe im Vergleich zu einem konstitutiv transkribierten Kontrollgen („Housekeeping“- Gen) oder im Vergleich zu einer Standardreihe exakt zu quantifizieren. Dieser Technik liegt die Messung der Fluoreszenz eines während der Reaktion freiwerdenden Farbstoffes zugrunde. Nach jedem PCR- Zyklus wird die Menge an Fluoreszenzfarbstoff in der zu untersuchenden Probe gemessen und quantitativ ausgewertet.

Um eine auswertbare, reproduzierbare Freisetzung eines Fluorophors zu erreichen, werden zwei unterschiedliche Techniken angewendet.

Zum einen funktioniert die „klassische“ Taqman Technik durch die Konstruktion einer spezifischen Sonde (Probe), die in dem zu amplifizierenden Gen zwischen den beiden verwendeten Primern hybridisiert. Sie besteht aus einem Oligonukleotid, das am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Carboxyfluorescein (FAM)) markiert ist. Am 3'-Ende trägt die Sonde einen Quencher-Farbstoff (Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)). Die Sonde ist in ihrer Nukleotidsequenz spezifisch für die zu amplifizierende cDNA-Matrize. Bei Anregung der intakten Sonde bei einer spezifische Wellenlänge (488nm) wird deren Fluoreszenz durch die räumliche Nähe vom Reporter-Farbstoff zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisieren Sonde und Primer gleichermaßen an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase trifft die Taq- Polymerase nun auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen, wodurch die 5'->3' Exonukleaseaktivität der Polymerase aktiviert und die Sonde hydrolysiert wird. Dadurch wird die räumliche Nähe und somit auch der FET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und die Emission des Reporters als Signal gemessen. Die freien, nicht-gebundenen Sonden werden nicht hydrolysiert. Die Fluoreszenz des Reporters steigt mit jedem PCR-Zyklus proportional der Akkumulation des PCR-Produktes an.

Neben dem Einsatz der spezifischen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid- Sonde, gibt es die Möglichkeit, den fluoreszierenden Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green zu verwenden.

SYBR<sup>®</sup> Green interkaliert während der Amplifikation in die Doppelstrang- DNA und lässt somit die Signalintensität proportional zur Produktmenge ansteigen.

RIG-I und PKR wurden mit SYBR<sup>®</sup> Green nachgewiesen, alle TLRs mit der klassischen Taqman-Technik. Die Real Time PCR wurde in einem Volumen von 25µl pro Well durchgeführt. In ein Well wurden 1µl cDNA (=0,025µg cDNA/ 25µl Reaktionsvolumen) und 12,5µl TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix bzw. SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix pipettiert. Hinzu kamen die entsprechenden Primer for und rev in einer Konzentration von jeweils 900nM und die Probes in einer Konzentration von 125nM. Zum Schluss wurde steriles Wasser bis zu dem totalen Volumen von 25 µl hinzugefügt.

Der TM- Mastermix enthält AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, MgCl<sub>2</sub> (5mM Endkonzentration), ROX (passiver Referenzfarbstoff) und eine Uracil-NGlycosylase. Der SYBR<sup>®</sup> Green- Mastermix enthält zusätzlich den Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green, allerdings nicht die Glycosylase.

Es wurde unter folgenden Bedingungen inkubiert:

1 Zyklus	50°C	2min	Uracil- NGlycosylase bewirkt die Hydrolyse Uracil- haltiger PCR- Produkte
1 Zyklus	95°C	10min	Inaktivierung der Glykosylase, Denaturierung der verdauten DNA- Proben, Aktivierung der Polymerase
40 Zyklen	95°C	15sec	Denaturierung
	60°C	1min	Annealing und Extension

Alle PCR- Proben wurden doppelt untersucht, außerdem wurden als Qualitätskontrolle NTCs (No Template Controls) mitgeführt. Für die Analyse der TLR- Expression wurden die von Zarembek und Godowski (Zarembek und Godowski, 2002) publizierten Primer verwendet. Sämtliche Reagenzien für die Real Time PCR wurden von Applied Biosystems bezogen. Die Primer und Probes (Tab. 3.7) wurden von der Fa. MWG, Ebersberg, bezogen.

Die Detektion des Fluoreszenzanstieges erfolgt für jeden Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe des ABI PRISM<sup>™</sup> 7700 Sequence Detectors. Die PCR- Informationen werden pro Zyklus gemessen und können über eine exponentielle Kurve verfolgt werden. Aus dieser exponentiellen Probenanalyse wird bei der Real Time PCR der C<sub>T</sub>-Wert („Threshold Cycle“) ermittelt, ein Schwellenwert zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR- Reaktion.

Die Quantifizierung der DNA von Interesse wurde relativ, d.h. im Verhältnis zur Expression des „house-keeping“ Gen GAPDH ermittelt.

**Tabelle 3.9 Oligonukleotidprimerpaare und Probes für Real-Time PCR von TLR 1-10 und GAPDH sowie PKR und RIG-I**

GAPDH probe	5'FAM-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'TAM	
GAPDH f / r	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
TLR1 probe	5'FAM-TGCCCATCCAAAATTAGCCCGTTCC-3'TAM	
TLR1 f / r	CAGTGTCTGGTACACGCATGGT	TTTCAAAAACCGTGTCTGTTAAGAGA
TLR2 probe	5'FAM-TCCATCCCATGTGCGTGGCC-3'TAM	
TLR2 f / r	GGCCAGCAAATTACCTGTGTG	AGGCGGACATCCTGAACCT
TLR3 probe	5'FAM-ACCCATACCAACATCCCTGAGCTGTCAA-3'TAM	
TLR3 f / r	CCTGGTTTGTAAATTGGATTAACGA	TGAGGTGGAGTGTTGCAAAGG
TLR4 probe	5'FAM-TGTCTGCCTCGCGCCTGGC-3'TAMRA	
TLR4 f / r	CCAGTGAGGATGATGCCAGAAT	GCCATGGCTGGGATCAGAGT
TLR5 probe	5'FAM-CCAGGGCAGGTGCTTATCTGACCTTAACA-3'TAM	
TLR5 f / r	TGCCTTGAAGCCTTCAGTTATG	CCAACCACCACCATGATGAG
TLR6 probe	5'FAM-TGCAACATCATGACCAAAGACAAAGAACCT-3'TAM	
TLR6 f / r	GAAGAAGAACAACCCTTTAGGATAGC	AGGCAAACAAAATGGAAGCTT
TLR7 probe	5'FAM-AGAGATACCGCAGGGCCTCCCG-3'TAM	
TLR7 f / r	TTAACCTGGATGGAAACCAGCTA	TCAAGGCTGAGAAGCTGTAAGCTA
TLR8 probe	5'FAM-TGATTTCCAGCCCCTGATGCAGC-3'TAM	
TLR8 f	TTATGTGTTCCAGGAACCTCAGAGAA	
TLR8 r	TAATACCCAAGTTGATAGTCGATAAGTTTG	
TLR9 probe	5'FAM-ACGATGCCTTCGTGGTCTTCGACAAA-3'TAM	
TLR9 f / r	GGACCTCTGGTACTGCTTCCA	AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT
TLR10 probe	5'FAM-TGACCCCAGCCACAACGACACT-3'TAM	
TLR10 f	TGTTATGACAGCAGAGGGTGATG	
TLR10 r	GAGTTGAAAAAGGAGGTTATAGGATAAATC	
PKR Forward	TCTGACTACCTGTCCTCTGGTTCTT	
PKR Reverse	GCGAGTGTGCTGGTCACTAAAG	
RIG-I Forward	CAGTATATTCAGGCTGAG	
RIG-I Reverse	GGCCAGTTTTCTTGTC	

### 3.3.8 Genetische Analyse

Es wurden für diese Arbeit SNPs (single nucleotide polymorphisms) der verschiedenen TLR-Gene untersucht (Abb. 3.2). Die genetische Assoziationsanalyse

wurde, wie in der Literatur beschrieben (Weidinger et al., 2004), mit dem MassARRAY system (Sequenom, San Diego, USA) durchgeführt.

Die DNA wurde mit Hilfe eines DNA Isolierungs- Kit (Genra Systems, Minneapolis, USA) gewonnen, welches nach Herstelleranweisungen angewendet wurde.

Genomische DNA (je 5ng) wurde durch die HotStarTaq Polymerase (Quiagen, Hilden, D) vervielfältigt. Die Primer wurden in einer Konzentration von je 167nmol/l zu dem PCR- Reaktionsvolumen von 6µl hinzugefügt. Anschließend wurde wie folgt inkubiert: 15min bei 95°C - hot start; dann 45 Zyklen: 30sec bei 95°C - Denaturierung, 30sec bei 56°C - Annealing, 1min bei 72°C - Extension; finale Inkubation 10min bei 72°C.

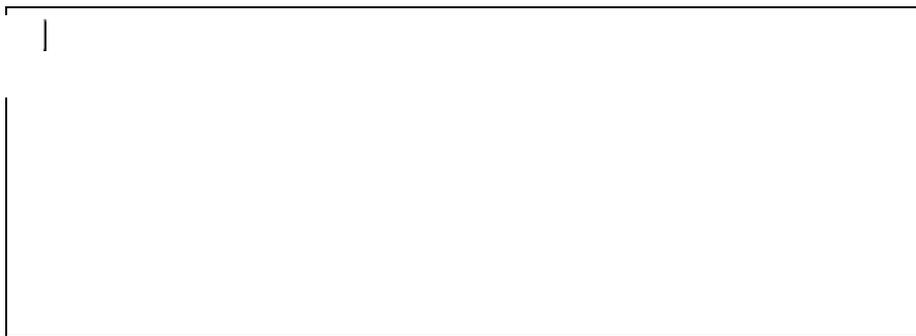
Dann wurde Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Amersham, Freiburg, D) für 20min bei 37°C zu den PCR- Produkten hinzugegeben, um überschüssige dNTPS (deoxyriboNucleosidtriphosphate) aus der PCR-Reaktion zu entfernen. Anschließend wurden die PCR- Produkte noch 10min bei 85°C inkubiert, um die SAP wieder zu inaktivieren.

Es folgt die hME (homogenous Mass Extension), eine universelle Methode, die für die Detektion der verschiedenen Allele eines SNP in zuvor amplifizierter DNA benutzt wird. Die Extensions- Primer werden so designed, dass sie genau eine Base vor dem zu analysierenden SNP enden. Um die Primer spezifisch zu verlängern, wird ein geeigneter Stopmix (der drei ddNTPs und ein dNTP enthält) zugegeben. Durch den Einbau eines ddNTP wird die Verlängerungsreaktion beendet. So entstehen die Extensionsprodukte, die sich je nach Allel in Länge und Masse unterscheiden. Die hME wird durch die Thermo- Sequenase (Amersham) katalysiert, die Extensionsprimer werden in einer Konzentration von 5,4 µmol/l zu den 10 µl Reaktionsvolumen gegeben. Die Inkubationsbedingungen für die hME waren Folgende: zunächst 2min bei 94°C, dann 40 Zyklen mit 94°C für 5sec, 52°C für 5sec und 72°C für 5sec. Die Inkubationsschritte für PCR und hME wurden in einem PTC-225 Tetrad PCR thermal cycler (MJ Research, Boston, USA) durchgeführt.

Anschließend wurden die Proben mit SpectroCLEAN Harz „Clean resin“ (Sequenom) behandelt, um etwaiges Salz zu entfernen, das die folgende Massenspektrometrie beeinträchtigen könnte. 16 µl resin- water suspension wurde mit der Multimek 96 channel Autopipette (Beckman Coulter, Fullerton, USA) jedem Well hinzugefügt, bis zu einem totalen Volumen von 26 µl.

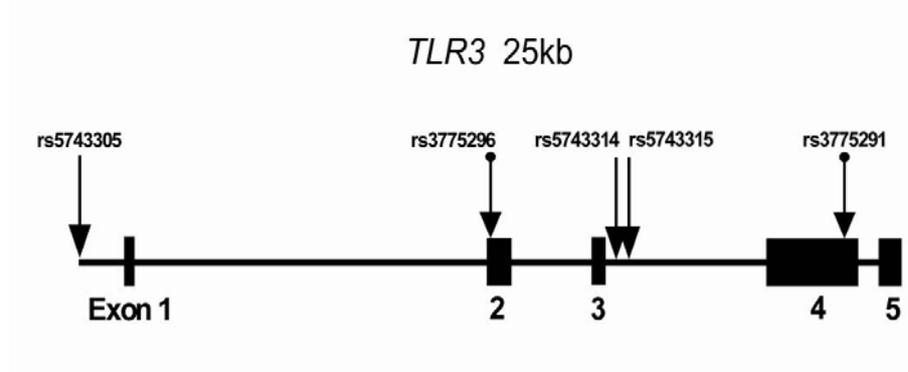
Die Verlängerungsprodukte sind jetzt zur Übertragung auf Chips mittels eines Nanoliterspotters (SpectroPoint Nanodispenser, Sequenom) bereit. Es werden 10 nl der Reaktionslösung pro well auf einen 284 format SpectroCHIP (Sequenom) übertragen. Der SpectroCHIP wurde vorher schon mit einer Matrix von 3- Hydroxy-Picolin- Säure gespotted.

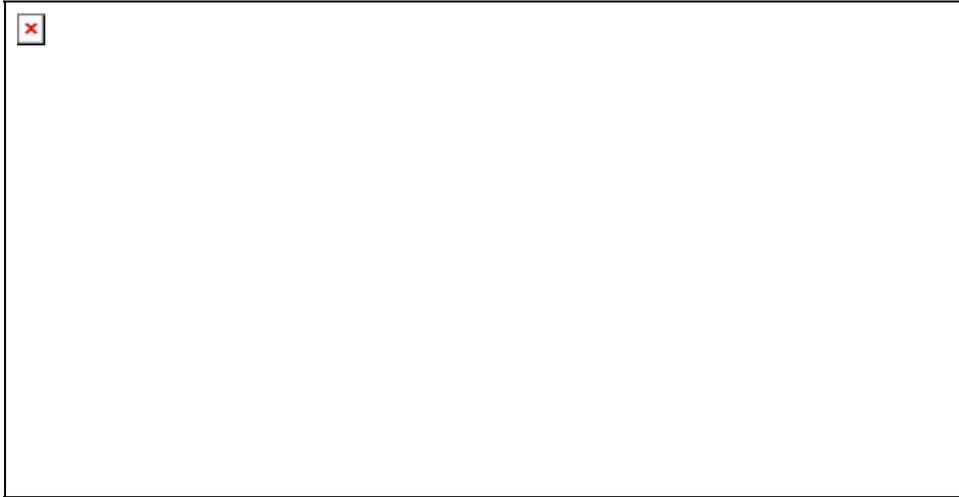
Matrix- assisted- laser desorption ionization (MALDI) time of flight (TOF) Massenspektrometrie (MS) ist eine Analysemethode zur Ermittlung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Durch das Verdampfen der Matrix mit Hilfe des Lasers wird das Oligonukleotid beschleunigt und bewegt sich im feldfreien Flugrohr mit einer masse- und ladungsabhängigen Geschwindigkeit auf einen Detektorschirm zu. Für die Datenerhebung der hier zu untersuchenden SpectroCHIPS kam ein modifizierter Bruker Biflex MALDI TOF- MS (Sequenom) zum Einsatz. Genotypisierungsabrufe wurden mit MASSARRAY RT software (Sequenom) in real time gemacht. Für die Analyse der Sequenzbindestellen wurde die Software MatInspector release 7.0 (Genomatix, München, D) verwendet.



**Abbildung 3.2**

Schematische Darstellung der analysierten SNPs innerhalb der TLR2-, TLR3- und TLR4- Gene.





### **3.3.9 Statistische Analyse**

Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels des Statistikprogramms SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Version 11.5 ausgewertet. Die Vergleiche zwischen Atopikern und Nicht- Atopikern wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. Der Wilcoxon-Rangsummentest ist ein nichtparametrisches Verfahren für unverbundene Stichproben und äquivalent zum Mann-Whitney-U-Test.

Die Vergleiche eines Markers nach Stimulation mit den unterschiedlichen TLR-Agonisten wurden mit dem Friedmann-Test für quantitative Merkmale beliebiger Verteilung bei mehr als zwei verbundenen Stichproben durchgeführt. Wenn in dem Friedmann-Test die Nullhypothese verworfen wurde, wurden die Signifikanzen anschließend durch den Wilcoxon-Vorzeichenrangtest, ein nichtparametrisches Verfahren für verbundene Stichproben, überprüft.

Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung, meist der Abweichungen von der Mediumkontrolle, angegeben. P- Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen, p- Werte größer als 0,05, aber kleiner als 0,15, als tendenziell signifikant.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung unstimulierter dendritischer Zellen

Um etwaige Veränderungen nach Stimulation mit TLR-Liganden einordnen zu können, wurden zunächst die unstimulierten mDCs charakterisiert. Außerdem wurden die Gruppen der Atopiker und der Nicht-Atopiker bezüglich der konstitutiven Expression der ausgewählten Oberflächenmarker verglichen.

Beispielhaft sind die Analysen der unstimulierten mDCs eines atopischen und eines nicht-atopischen Spenders in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Analysen sind als Punktdiagramme (Dot Plot) abgebildet, wobei die Ordinate in Abbildung 4.1 A Informationen über die Zellgröße und die Abszisse wiederum Informationen über die Granularität des Zytoplasmas bereitstellt. In dieser Darstellung wurde das Gate R1 nach Erfahrungswerten für die Population der mDCs bestimmt.

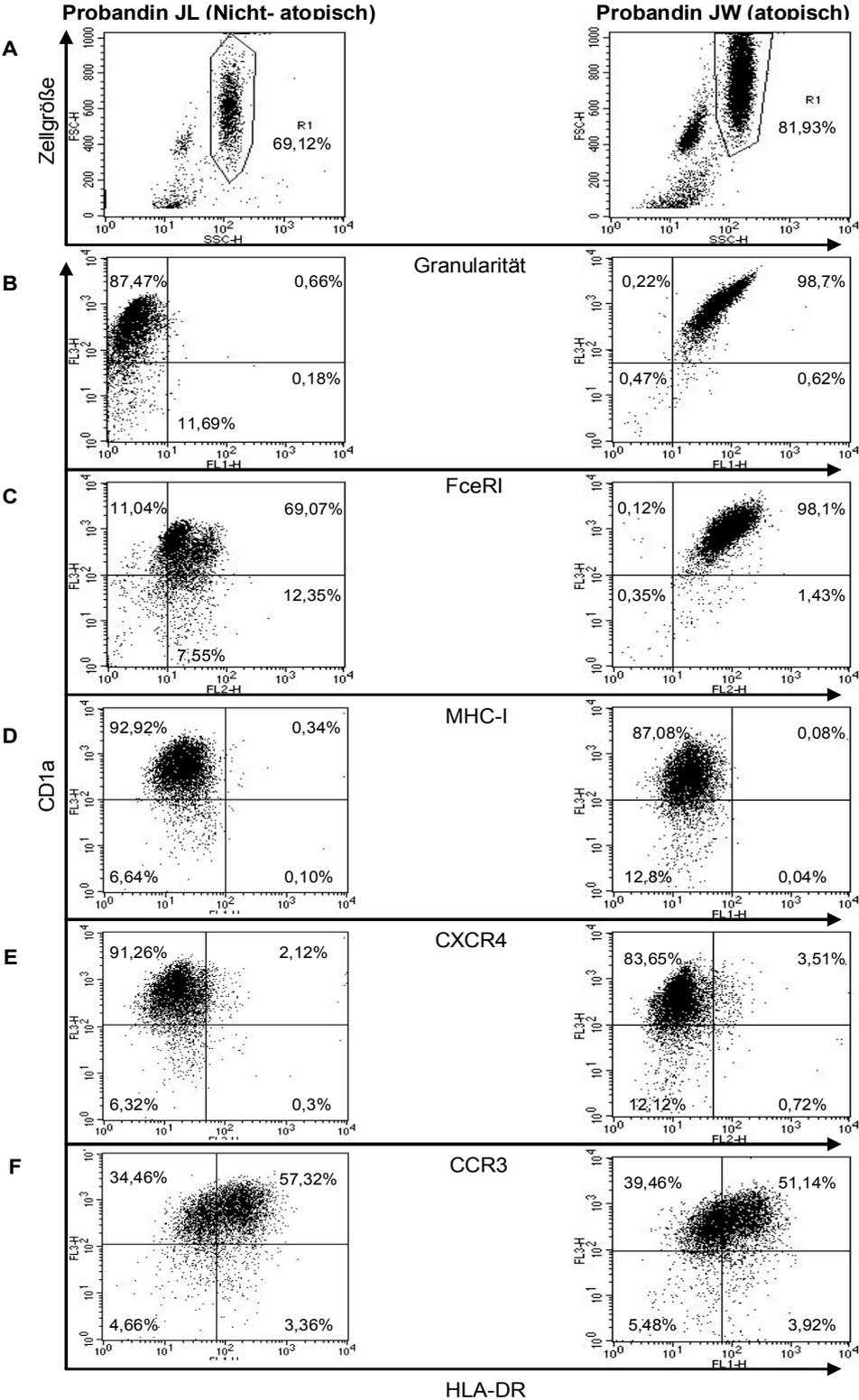
In den Abbildungen 4.1 B- K zeigen Abszisse und Ordinate die relative Fluoreszenzintensität der zellgebundenen Antikörper an. Die Ordinate demonstriert die Intensität des CD1a Antikörpers. In diesen Dot Plots (Abb. 4.1 B- K) werden nur noch die Zellen, die in diesem Gate R1 liegen, dargestellt. Man sieht also, dass alle durch das Gate R1 selektierten Zellen CD1a<sup>+</sup> sind. Der Anteil der im Gate R1 befindlichen, CD1a<sup>+</sup> mDCs betrug im Mittel etwa 60 % der geernteten Zellen.

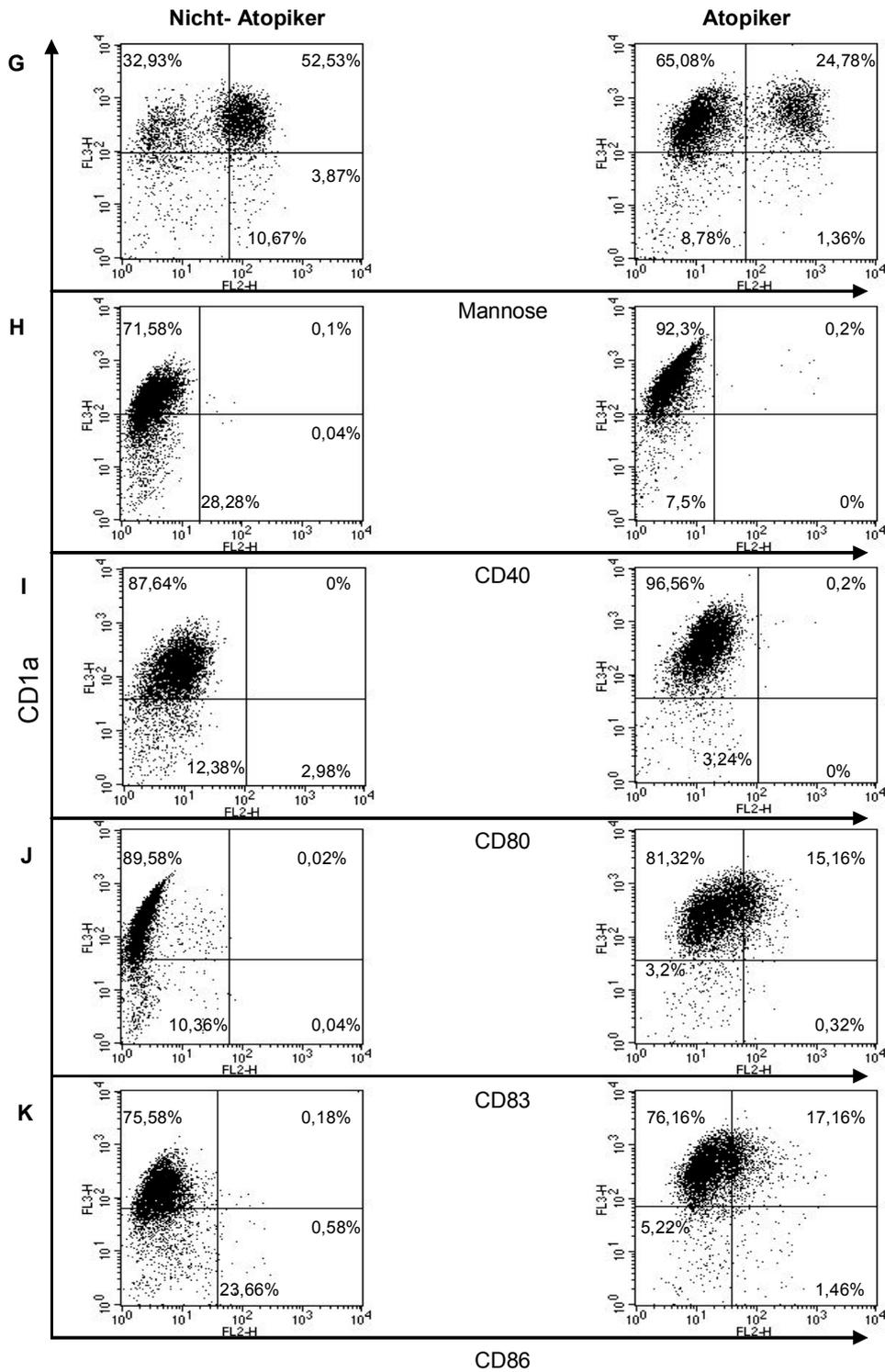
In Abbildung 4.2 wird die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der einzelnen Marker in Boxplot- Diagrammen von untersuchten, unstimulierten mDCs 5 nicht-atopischer und 8 atopischer Spender dargestellt.

Für den hochaffinen Fc epsilon Rezeptor (FcεRI) konnte keine statistisch signifikant erhöhte Expression der atopischen Zellen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Beide Gruppen sind positiv für den Mannose-Rezeptor (Abb. 4.1 G, Abb. 4.2 F) und für HLA-DR (Abb. 4.1 F, Abb. 4.2 E). MHC I, CXCR4 und CCR3 werden von den unstimulierten mDCs wenig exprimiert (Abb. 4.1 C,D,E, Abb. 4.2 B,C,D).

Die Reifungsmarker CD40, CD80, CD83 und CD86 (Abb. 4.1 H, I, J, K; 4.2 G,H,I,J) werden kaum exprimiert von den unstimulierten, unreifen mDCs. Die untersuchten mDCs der atopischen Gruppe zeigten eine leicht höhere Basalexpression dieser Marker im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe.

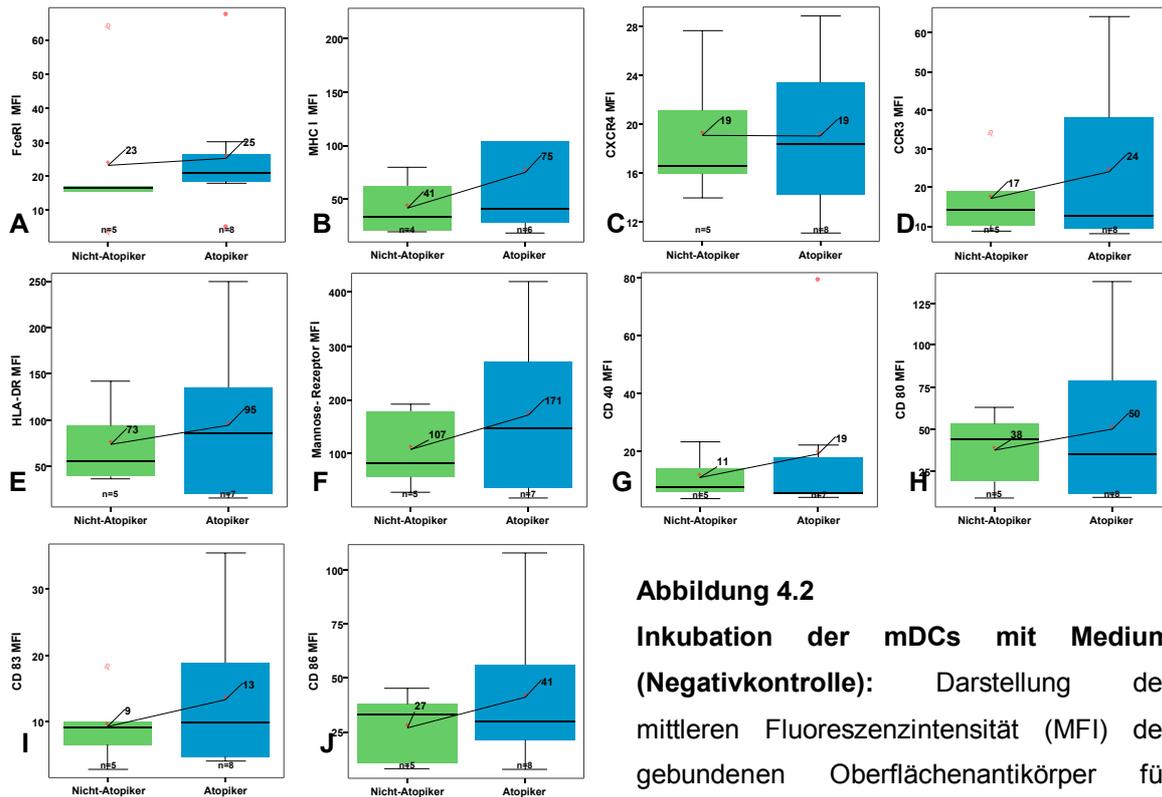
Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der konstitutiven Expression der untersuchten Oberflächenmarker zwischen atopischen Zellen und der Kontrollgruppe.





**Abbildung 4.1**

**Expressionsprofile von Oberflächenmolekülen** auf unstimulierten dendritischen Zellen am achten Tag nach Kultivierung, durchflusszytometrische Analyse. Linke Seite: Zellen eines nicht-atopischen Spenders, rechte Seite: Zellen eines atopischen Spenders. In **A** wird die gesamte Zellsuspension dargestellt in der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung, Gate R1 umfasst die Population der dendritischen Zellen. **B – K** stellen ausschließlich die gegateten, dendritischen Zellen in Mehrfachfärbungen dar: CD1a- Cychrome gegen FcεRI, ungekoppelter Antikörper, in einem zweiten Schritt mit Goat-Anti-Mouse- FITC gefärbt (**B**); gegen MHC-I- PE (**C**); gegen CXCR4- FITC (**D**); gegen CCR3- PE (**E**); gegen HLA-DR- FITC (**F**); gegen Mannose- Rezeptor- PE (**G**); gegen CD40- PE (**H**); gegen CD80- PE (**I**); gegen CD83- PE (**J**); gegen CD86- PE (**K**). Die Prozentzahlen entsprechen dem Anteil des Gate R1 bzw. den Anteilen der einzelnen, eingezeichneten Quadranten an der Gesamtzellzahl.



**Abbildung 4.2**

**Inkubation der mDCs mit Medium (Negativkontrolle):** Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der gebundenen Oberflächenantikörper für FcεRI(A), MHC I(B), CXCR4(C), CCR3(D), HLA-DR(E), Mannose- Rezeptor (F), CD40(G), CD80(H), CD83(I) und CD86(J).

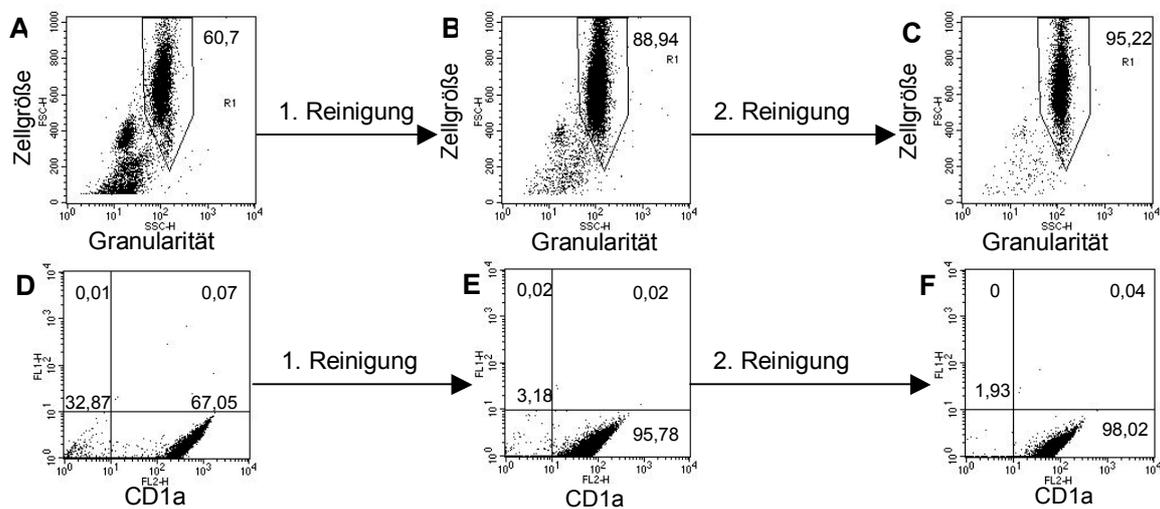
## 4.2 Nachweis der konstitutiven TLR- Expression in humanen, von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen

### 4.2.1 Aufreinigung von dendritischen Zellen für die PCR

Es wurden insgesamt 13 Zellkulturen, 7 nicht- atopische und 6 atopische erfolgreich für die PCR aufgereinigt. Die Aufreinigung von unstimulierten, am siebten Tag geernteten DCs wurde mit dem MACS- System unternommen. Die Zellen wurden, wie unter 3.3.4.2. beschrieben, mit Hilfe des CD1a Antikörpers positiv selektiert. Zusätzlich wurde in der anschließenden FACS- Analyse in der Darstellung der Granularität und Zellgröße das Gate R1 für die mDCs gelegt.

Die in der Folge angegebenen Zahlen sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus insgesamt 13 Experimenten. In Abbildung 4.3 ist der Vorgang am Beispiel eines Spenders graphisch veranschaulicht.

Von den untersuchten, frisch geernteten Zellen lagen  $61\% \pm 11,4$  der Zellen im Gate (Abb. 4.3A),  $70\% \pm 6,5$  waren  $CD1a^+$  (Abb. 4.3D). Nach dem 1. Separationsdurchgang lagen  $86\% \pm 11,8$  der selektierten Zellen im Gate (Abb. 4.3B) und  $90\% \pm 9,2$  waren  $CD1a^+$  (Abb. 4.3E). Nach dem 2. Separationsdurchgang befanden sich  $95\% \pm 6,8$  der selektierten Zellen im Gate (Abb. 4.3C),  $97\% \pm 4,8$  waren  $CD1a^+$  (Abb. 4.3F). Die Zellen wurden also im Durchschnitt  $34\%$  reiner bei der Beurteilung nach Granularität und Zellgröße und  $27\%$  reiner, wenn man die Expression des  $CD1a^+$  Markers als DC- spezifisches Kriterium betrachtet. Diese Reinheit versichert, dass die in der PCR erhaltenen Ergebnisse auch tatsächlich von den mDCs stammen.



**Abbildung 4.3**

**FACS- Diagramme von der Sortierung dendritischer Zellen** am siebten Tag in Kultur. Das Gate R1 beschreibt die als dendritische Zellen angenommene Population in der Darstellung der Granularität und Zellgröße. Die Zahlen in den Diagrammen **A**, **B** und **C** zeigen den Prozentanteil der dendritischen Zellen an der Zellsuspension. Die Zellen, die in den Diagrammen **D**, **E** und **F** dargestellt sind, sind einfach mit  $CD1a$ - PE gefärbt. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der einzelnen, eingezeichneten Quadranten an der gesamten Zellzahl an. **A** und **D** zeigen die unbehandelten Zellen direkt aus der Kultur, **B** und **E** die positiv selektierten Zellen aus dem 1. Separationsvorgang, **I** und **J** die positiv selektierten Zellen aus dem 2. Separationsvorgang

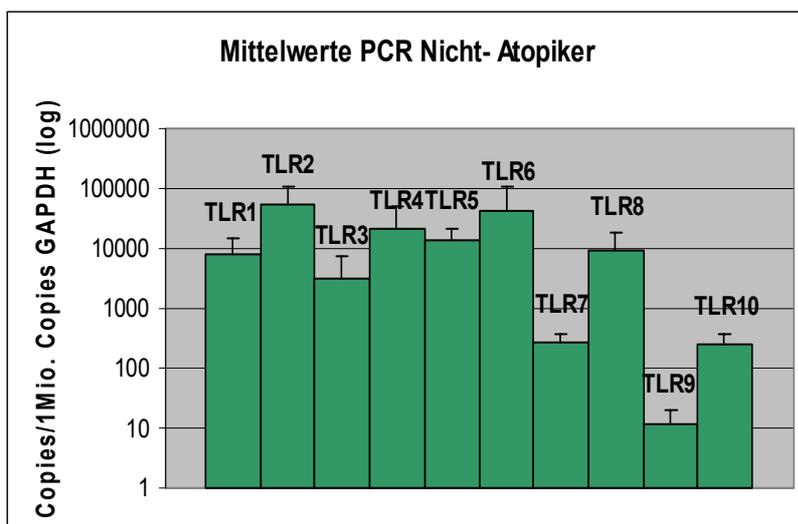
#### 4.2.2 Ergebnisse der Real Time PCR

Mit Hilfe der quantitativen real time Reverse Transkriptase PCR für die TLRs 1-10 wurde die relative Transkription im Vergleich zur GAPDH- Expression untersucht (Abb. 4.4). Man misst die Menge der vorhandenen, konstitutiv exprimierten mRNA.

Es wurden 7 Proben der atopischen Probanden und 5 der nicht- atopischen Probanden, die auch an den anderen Untersuchungen teilgenommen hatten, analysiert. Außerdem wurde noch eine weitere, nicht- atopische Probe geprüft.

Alle TLRs werden von den untersuchten mDCs exprimiert. Außerdem zeigten atopische (Abb. 4.4A) und nicht- atopische mDCs (Abb. 4.4B) gleiche Expressionsmuster, wobei die atopischen Zellen generell etwas stärker exprimierten. Statistisch signifikant war der Unterschied zwischen stärker exprimierenden Atopikern und der schwächer exprimierenden gesunden Kontrollgruppe bei TLR1 ( $p= 0,032$ ), bei TLR7 ( $p= 0,045$ ) und in der Tendenz bei TLR8 ( $p= 0,063$ ).

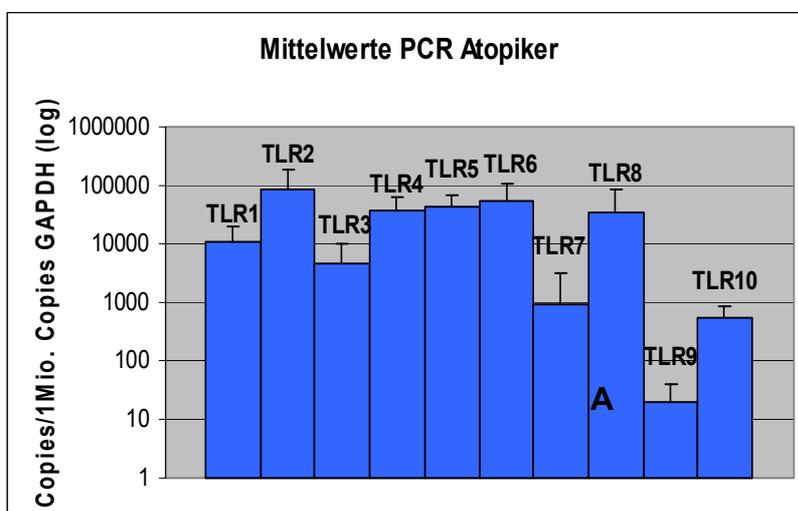
Bei beiden Gruppen wird TLR 2 am stärksten exprimiert, gefolgt von TLR6, TLR4, TLR5 und TLR8. Etwas weniger exprimiert werden TLR1 und TLR3, gefolgt von TLR 7 und TLR 10. TLR 9 wird nur sehr schwach exprimiert.



**Abbildung 4.4**  
**Real Time PCR zum Nachweis der TLR- Transkription.**

Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 6 (Nicht- Atopiker- **A**) bzw. 7 (Atopiker- **B**) verschiedenen Experimenten dargestellt.

**A**



**B**

### **4.3 Nachweis des Einflusses von TLR-Agonisten auf die Oberflächenmarkerexpression humaner, von Monozyten abgeleiteter dendritischer Zellen**

Nachdem wir die Expression von TLR 1-10 auf den DCs nachgewiesen haben, untersuchten wir den Einfluss ausgewählter Liganden dieser TLRs auf die Funktion der mDCs atopischer und nicht- atopischer Probanden. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden nach 24-stündiger Inkubation mit Peptidoglykan (PGN), Poly IC, Lipopolysaccharid (LPS), Flagellin, CpG, Non CpG und Medium als Negativkontrolle durchgeführt.

#### **4.3.1 Stimulation mit PGN**

Peptidoglykan (PGN) ist ein Hauptbestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien und aktiviert TLR2.

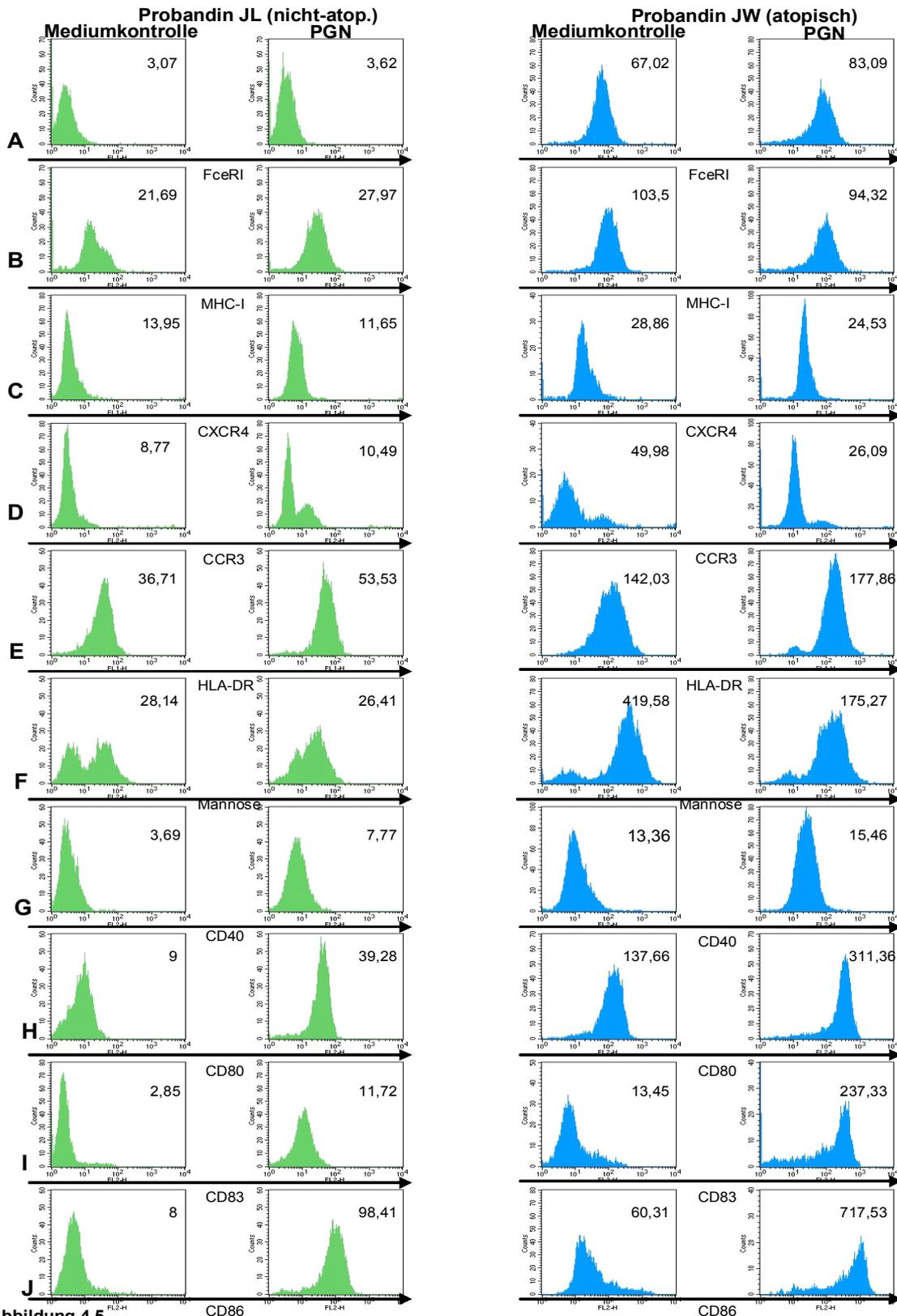
TLR2 mRNA wurde in unseren PCR- Analysen von allen untersuchten TLR1-10 am stärksten exprimiert. In der PCR- Analyse zeigte sich diesbezüglich kein Unterschied zwischen der Gruppe der Atopiker und der Kontrollgruppe. Nun wollten wir in funktionellen Analysen herausfinden, wie PGN als TLR2- Ligand auf mDCs wirkt und ob sich ein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen zeigt.

Die Expression des FcεRI blieb unverändert (Abb. 4.5A, Abb. 4.6A) genauso wie die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 (Abb. 4.5C, Abb. 4.6C) und CCR3 (Abb. 4.5D, Abb. 4.6D). Die Expression der antigenpräsentierenden Moleküle MHC-I (Abb. 4.5B, Abb. 4.6B) und HLA-DR (Abb. 4.5E, Abb. 4.6E) wird bei Nicht- Atopikern tendenziell mehr gesteigert als bei Atopikern. Die Expression des Mannose-Rezeptors steigert sich bei den Atopikern deutlicher als bei den Nicht- Atopikern (Abb. 4.5F, Abb. 4.6F).

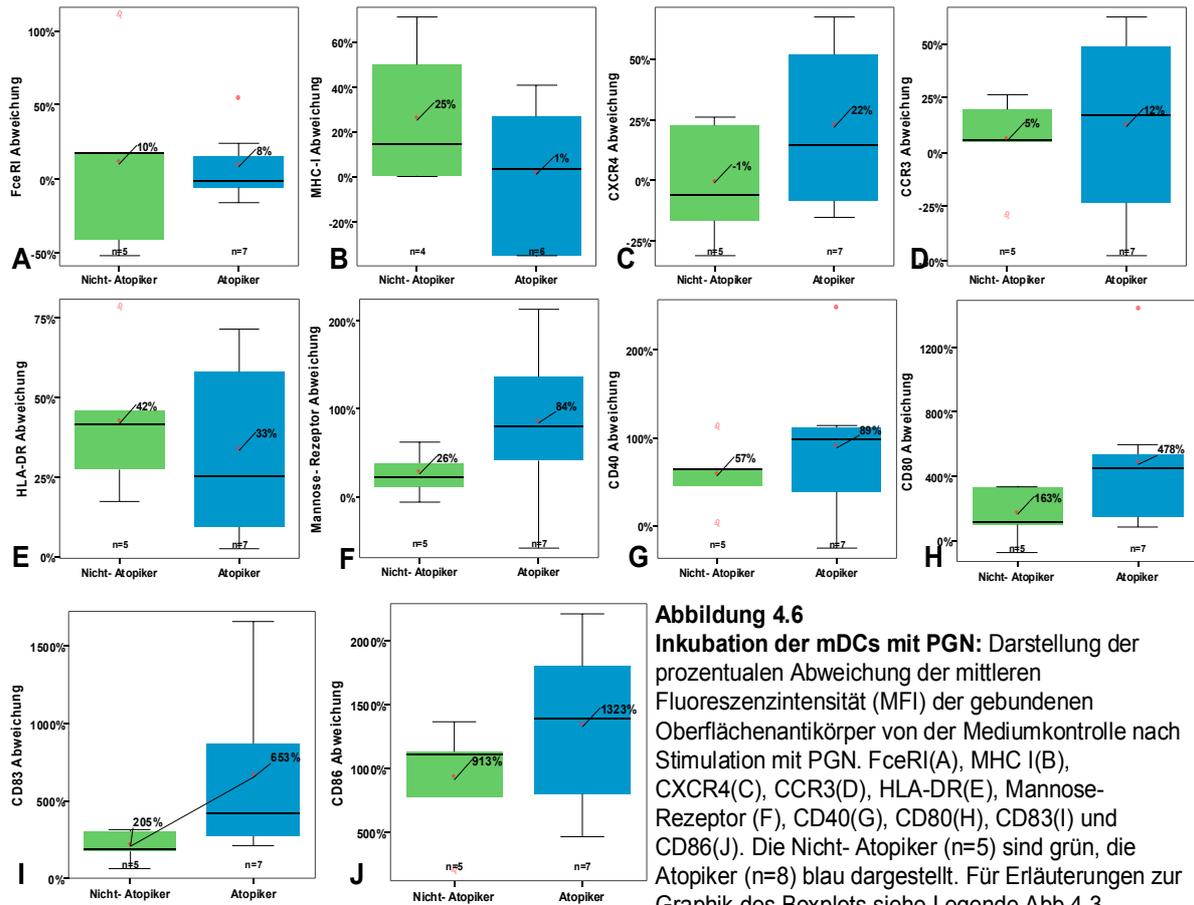
Alle vier untersuchten Reifungsmarker CD40, CD80 (Abb. 4.5H, Abb. 4.6H), CD83 und CD86 werden verstärkt exprimiert, somit wird deutlich, dass mDCs sich durch PGN aktivieren lassen und eine Reifung durchmachen. Die Steigerung fällt bei CD40 (Abb. 4.5G, Abb. 4.6G) relativ gering aus, am deutlichsten ist sie bei CD86 mit einer Steigerung um 1323% bei den Atopikern und 913% bei den Nicht- Atopikern (Abb. 4.5J, Abb. 4.6J).

Bei allen vier Reifungsmarkern fällt die Steigerung bei den Atopikern stärker aus als bei den Nicht- Atopikern. Eine Tendenz zu einem signifikanten Unterschied fand sich

in der Analyse der Expression der Marker CD83 (p- Wert= 0,123, Abb.4.5I, Abb.4.6I) und CD86 (p-Wert = 0,062).



**Abbildung 4.5**  
**Expressionsprofile von Oberflächenmolekülen nach Stimulation mit PGN (24h) auf dendritischen Zellen am achten Tag nach Kultivierung, Vergleich mit der Mediumkontrolle, durchflusszytometrische Analyse. Linke Seite: Zellen eines nicht- atopischen Spenders, rechte Seite: Zellen eines atopischen Spenders. Die angegebenen Zahlen demonstrieren die Werte des Mittelwertes der Fluoreszenz (MFI) des Histogramms.**



**Abbildung 4.6**  
**Inkubation der mDCs mit PGN:** Darstellung der prozentualen Abweichung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der gebundenen Oberflächenantikörper von der Mediumkontrolle nach Stimulation mit PGN. FcεRI(A), MHC I(B), CXCR4(C), CCR3(D), HLA-DR(E), Mannose-Rezeptor (F), CD40(G), CD80(H), CD83(I) und CD86(J). Die Nicht- Atopiker (n=5) sind grün, die Atopiker (n=8) blau dargestellt. Für Erläuterungen zur Graphik des Boxplots siehe Legende Abb.4.3

### 4.3.2 Stimulation mit Poly IC

TLR3 ist auf die Erkennung von bestimmten Merkmalen von Nukleinsäuren spezialisiert, er erkennt Doppelstrang- RNA- Moleküle ab einer Größe von 30 Basen. Poly IC ist ein synthetisches Analogon zu viraler dsRNA und bindet an den TLR3-Rezeptor.

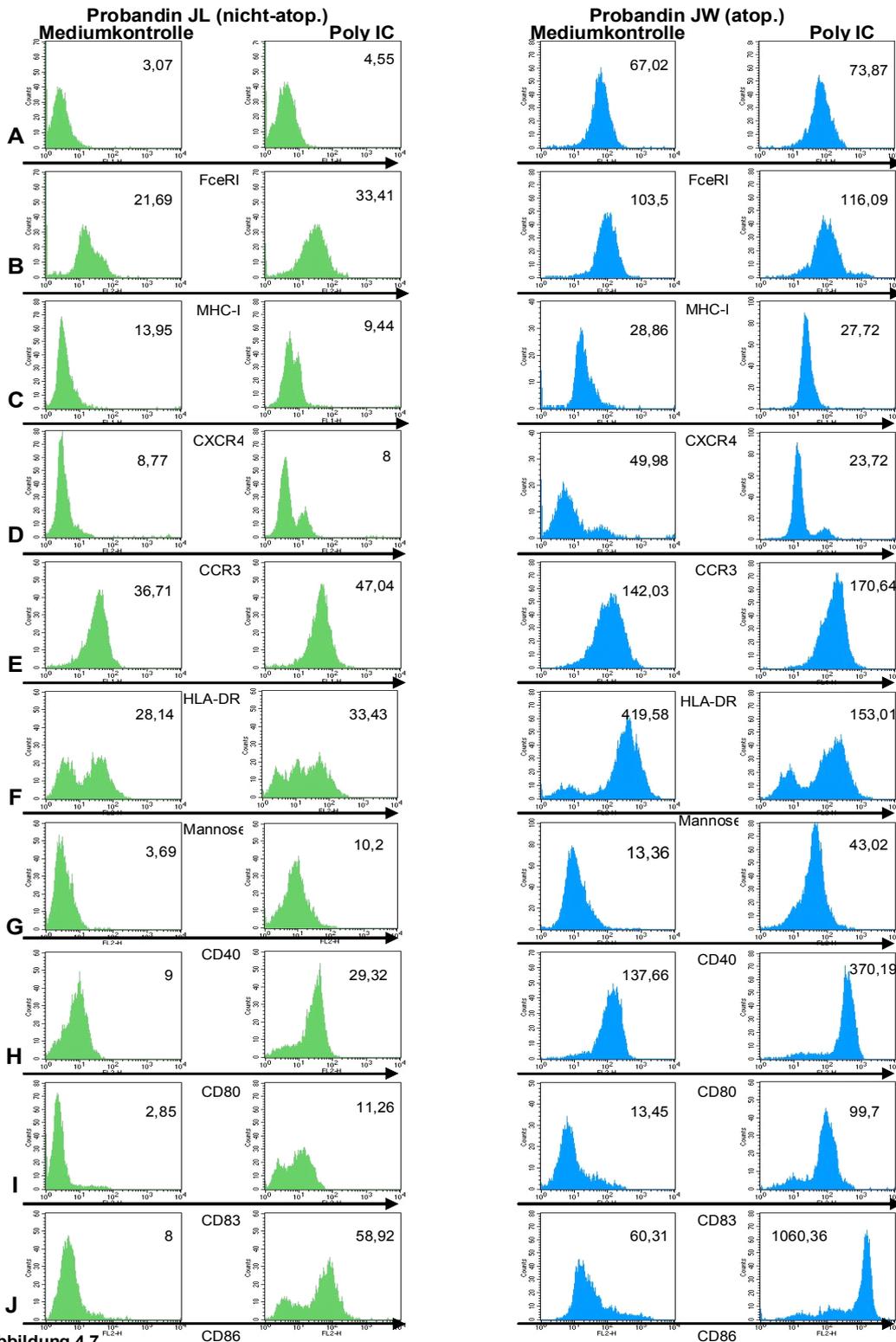
TLR3 mRNA wurde relativ schwach transkribiert von den untersuchten mDCs. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei untersuchten Gruppen nachgewiesen

Bei der Ausprägung des hochaffinen Fc epsilon Rezeptors FcεRI (Abb. 4.7A, Abb. 4.8A) zeigen sich ebenso wie bei den Chemokinrezeptoren CXCR4 (Abb. 4.7C, Abb. 4.8C) und CCR3 (Abb. 4.7D, Abb. 4.8D) keine Veränderungen im Vergleich zur Mediumkontrolle. Sowohl die zum MHC- Komplex gehörenden Moleküle MHC I und HLA-DR (Abb. 4.7E, Abb. 4.8E) als auch der Mannose- Rezeptor (Abb. 4.7F, Abb. 4.8F) werden jedoch hochreguliert. Für MHC I liegt die durchschnittliche Steigerung bei den Nicht- Atopikern bei 49%, bei den Atopikern bei 8% (Abb. 4.7B, Abb. 4.8B). Der Unterschied in der Expression von MHC I hat eine Tendenz zur Signifikanz bei einem p- Wert von 0,136.

Die Reifungsmarker CD40, CD80, CD83 und CD86 sind nach der Inkubation mit Poly IC verstärkt auf der Oberfläche nachweisbar. Bei CD40 fiel die Steigerung im Vergleich zur Mediumkontrolle am geringsten aus, auch war hier kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen zu entdecken (Abb. 4.7G, Abb. 4.8G). Die größte Steigerung findet sich bei CD86, bei den nicht- atopischen dendritischen Zellen findet sich im Durchschnitt eine Steigerung um 712%, bei den atopischen mDCs eine Steigerung um 1241% (Abb. 4.7J, Abb. 4.8J). Dieser Unterschied zwischen den zwei Gruppen ist mit einem p- Wert von 0,013 als statistisch signifikant einzustufen.

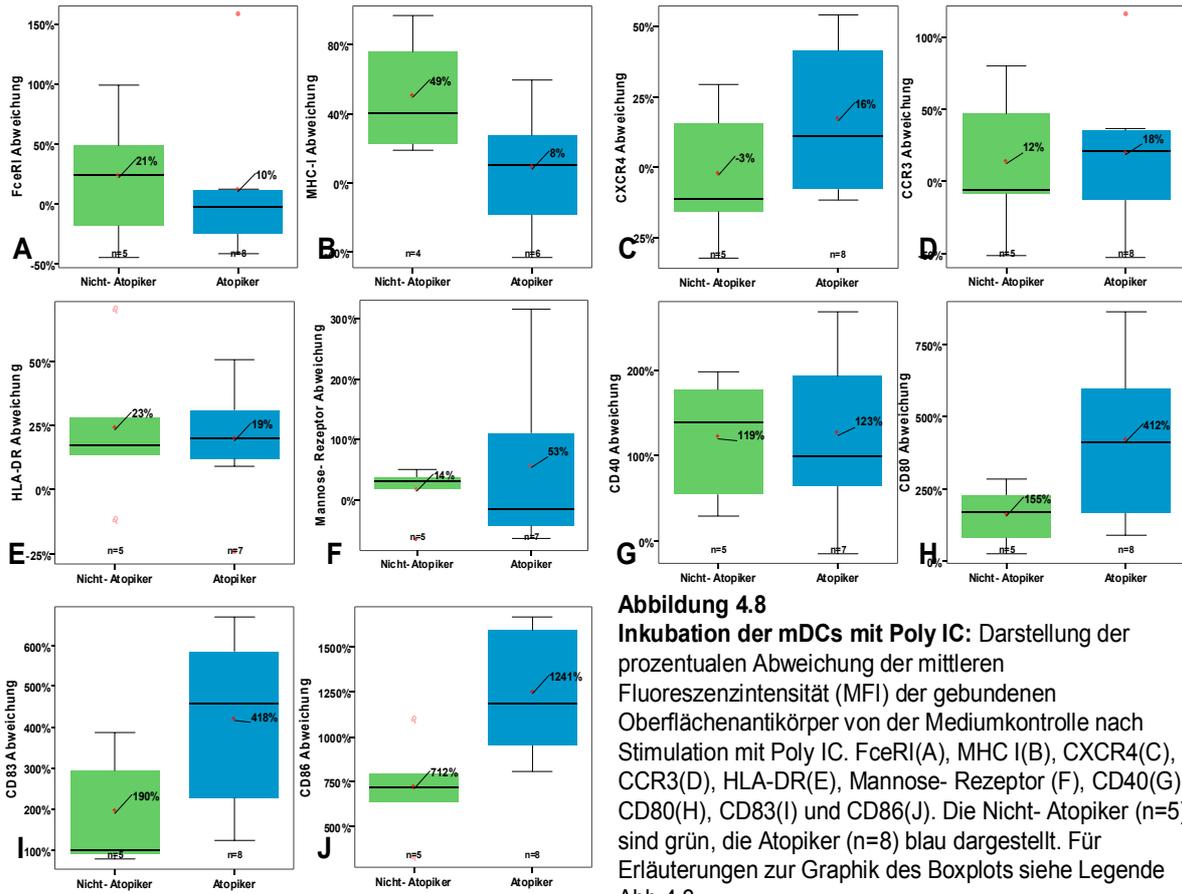
Auch statistisch signifikant ist der Unterschied in der Expression von CD83 zwischen Atopikern und Nicht- Atopikern ( $p=0,028$ ). Im Durchschnitt steigert sich die Expression nach Inkubation mit Poly IC im Vergleich zur Mediumkontrolle bei den Nicht- Atopikern um 190%, bei den Atopikern um 418% (Abb. 4.7I, Abb. 4.8I). Auch CD80 wird stärker exprimiert, der Mittelwert der Steigerung liegt für die Nicht- Atopiker bei 155%, für die Atopiker bei 412% (Abb. 4.7H, Abb. 4.8H). Hier findet sich mit einem p- Wert von 0,057 die Tendenz zur Signifikanz.

MDCs lassen sich also durch Poly IC stimulieren und aktivieren, wobei die untersuchten Zellen atopischer Spender stärker reagierten.



**Abbildung 4.7**

**Expressionsprofil von Oberflächenmolekülen nach Stimulation mit Poly IC (24h) auf dendritischen Zellen am siebten Tag nach Kultivierung, Vergleich mit der Mediumkontrolle, durchflusszytometrische Analyse. Linke Seite: Zellen eines nicht-atopischen Spenders, rechte Seite: Zellen eines atopischen Spenders. Die angegebenen Zahlen demonstrieren die Werte des Mittelwertes der Fluoreszenz (MFI) des Histogramms.**



**Abbildung 4.8**  
**Inkubation der mDCs mit Poly IC:** Darstellung der prozentualen Abweichung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der gebundenen Oberflächenantikörper von der Mediumkontrolle nach Stimulation mit Poly IC. FcεRI(A), MHC I(B), CXCR4(C), CCR3(D), HLA-DR(E), Mannose- Rezeptor (F), CD40(G), CD80(H), CD83(I) und CD86(J). Die Nicht- Atopiker (n=5) sind grün, die Atopiker (n=8) blau dargestellt. Für Erläuterungen zur Graphik des Boxplots siehe Legende Abb.4.3

### 4.3.3 Stimulation mit LPS

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und bindet an TLR4.

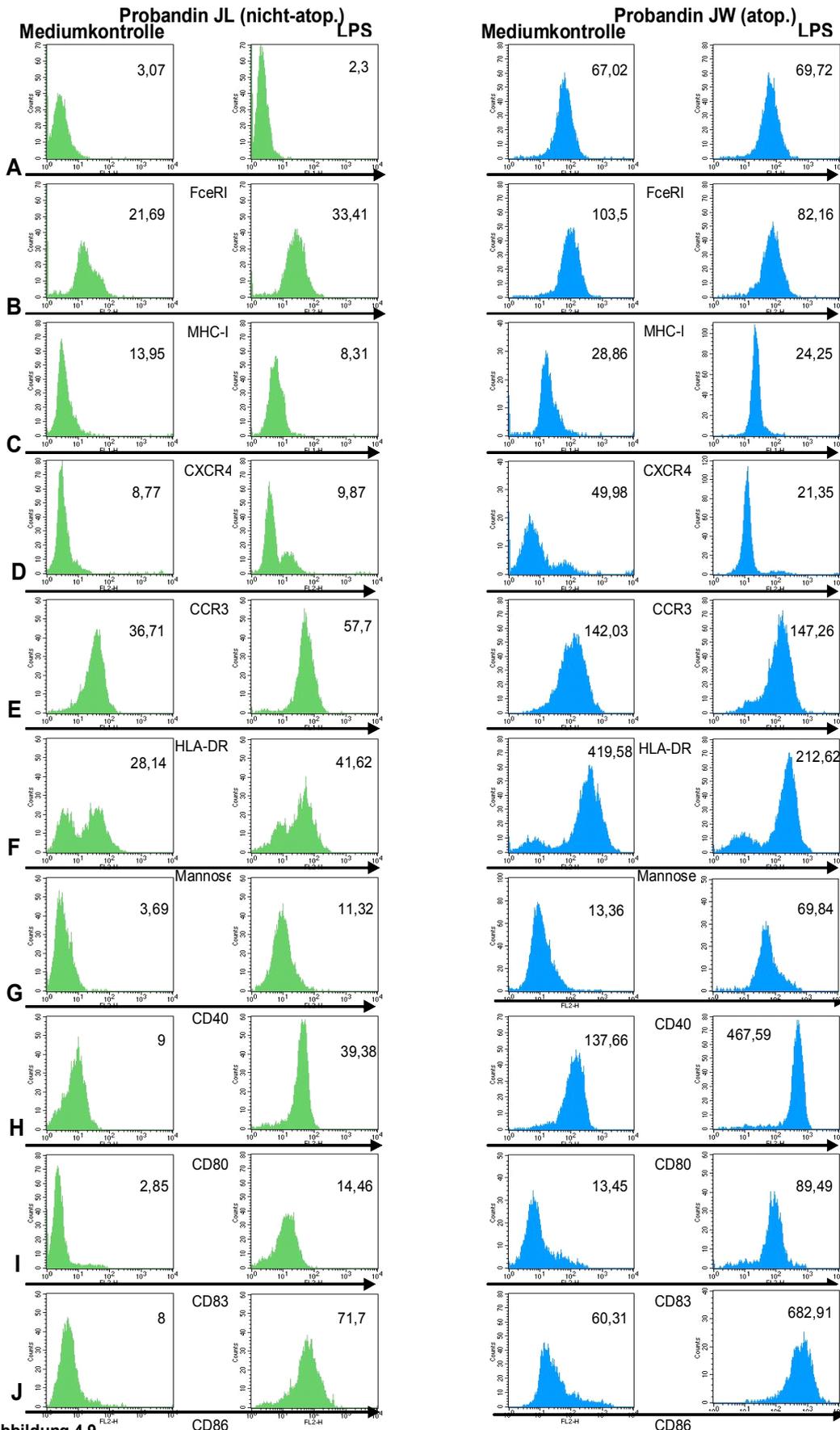
Die Oberflächenmarker FcεRI (Abb. 4.9A, Abb. 4.10A), CXCR4 (Abb. 4.9C, Abb. 4.10C) und CCR3 (Abb. 4.9D, Abb. 4.10D) zeigen keine auffallenden Unterschiede nach Stimulation mit LPS im Vergleich zur Negativkontrolle.

Die Inkubation mit LPS führt zu einem stärkeren Anstieg der MHC I Expression bei Nicht-Atopikern (36%) als bei den untersuchten Atopikern, bei denen die MHC I Expression hier sogar im Durchschnitt um -14% abnahm (Abb. 4.9B, Abb. 4.10B). Mit einem p-Wert von 0,088 liegt hier die Tendenz zur Signifikanz vor.

Auch der andere zum MHC-Komplex gehörende Oberflächenmarker HLA-DR nimmt bei den Nicht-Atopikern (55%) mehr zu als bei den Atopikern (15%) (Abb. 4.9E, Abb. 4.10E). Dieser Unterschied ist bei einem p-Wert von 0,028 statistisch signifikant.

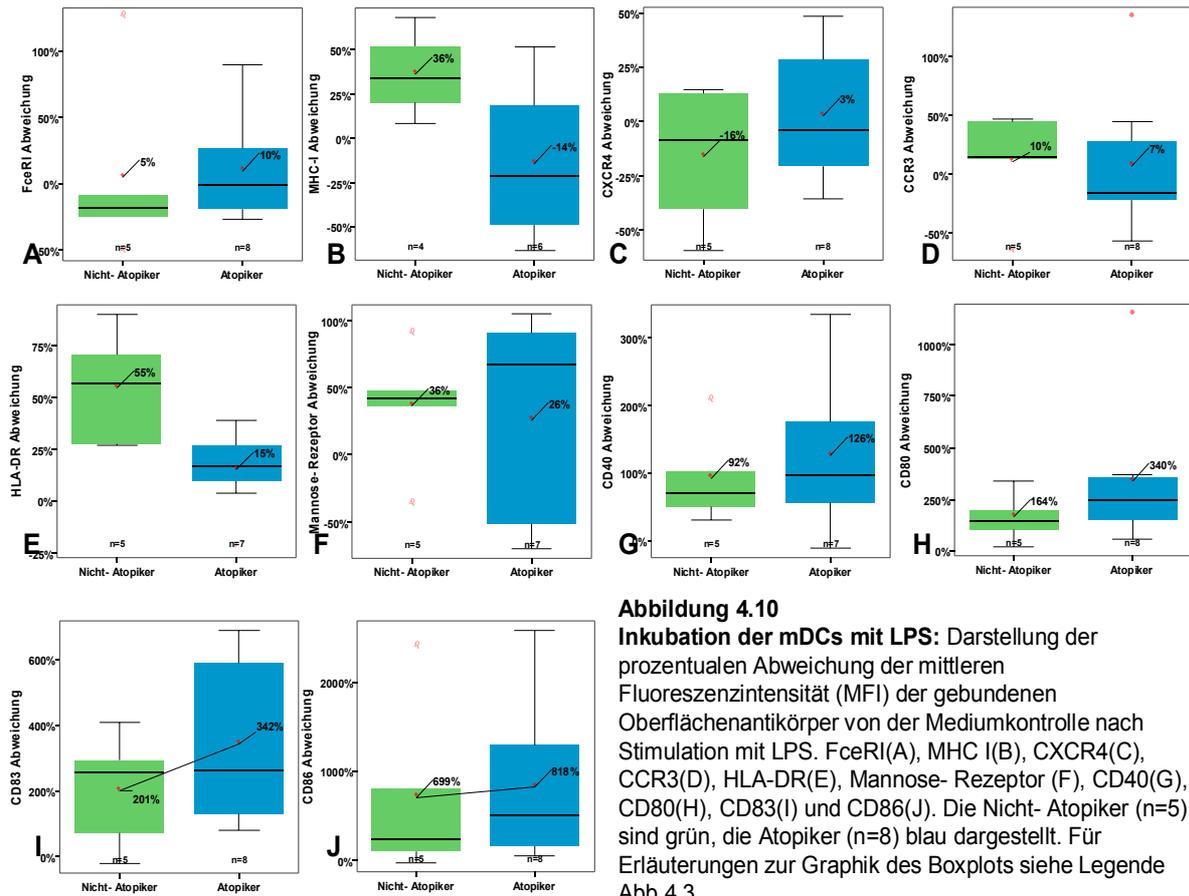
Die Expression des Mannose Rezeptors steigt bei den meisten Proben leicht an (Abb. 4.9F, Abb. 4.10F).

Auch nach Inkubation mit LPS nimmt die Expression der Reifungsmarker CD40, CD80 (Abb. 4.9H, Abb. 4.10H), CD83 (Abb. 4.9I, Abb. 4.10I) und CD86 im Vergleich zur Mediumskontrolle zu. Wieder ist die Steigerung bei CD40 am schwächsten (Abb. 4.9G, Abb. 4.10G) und bei CD86 am stärksten ausgeprägt (Abb. 4.9J, Abb. 4.10J). Alle vier Reifungsmarker werden bei den Atopikern stärker induziert als bei den Nicht-Atopikern. Die bewirkte Reifung der DCs bestätigt also das in der PCR herausgefundene Vorhandensein von TLR4 bei den untersuchten mDCs.



**Abbildung 4.9**

**Expressionsprofile von Oberflächenmolekülen nach Stimulation mit LPS (24h) auf dendritischen Zellen am achten Tag nach Kultivierung, Vergleich mit der Mediumkontrolle, durchflusszytometrische Analyse. Linke Seite: Zellen eines nicht- atopischen Spenders, rechte Seite: Zellen eines atopischen Spenders. Die angegebenen Zahlen demonstrieren die Werte des Mittelwertes der Fluoreszenz (MFI) des Histogramms.**



**Abbildung 4.10**

**Inkubation der mDCs mit LPS:** Darstellung der prozentualen Abweichung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der gebundenen Oberflächenantikörper von der Mediumkontrolle nach Stimulation mit LPS. FceRI(A), MHC I(B), CXCR4(C), CCR3(D), HLA-DR(E), Mannose- Rezeptor (F), CD40(G), CD80(H), CD83(I) und CD86(J). Die Nicht- Atopiker (n=5) sind grün, die Atopiker (n=8) blau dargestellt. Für Erläuterungen zur Graphik des Boxplots siehe Legende Abb.4.3

#### 4.3.4 Stimulation mit Flagellin

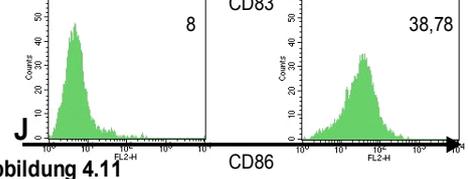
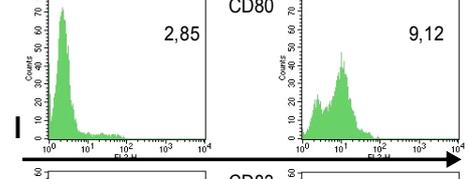
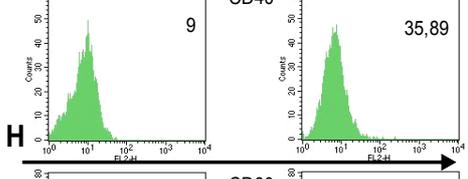
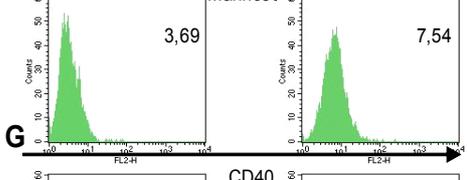
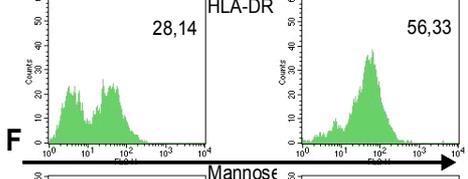
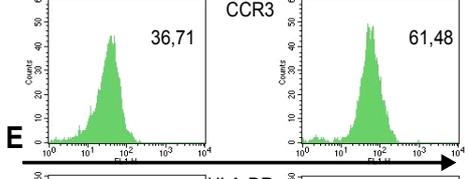
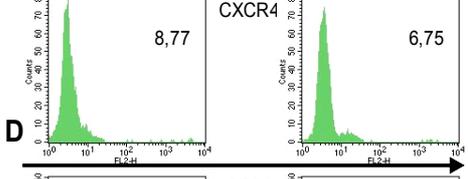
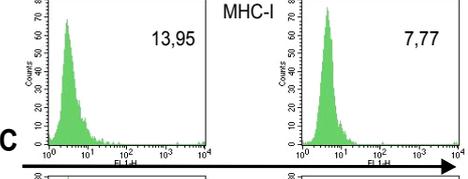
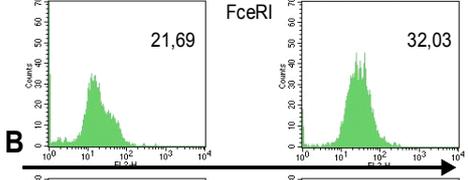
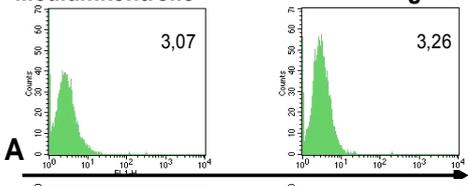
Flagellin, die Hauptproteinstruktur in bakteriellen Geißeln bindet an TLR5.

Der FcεRI (Abb. 4.11A, Abb. 4.12A) und die Chemokinrezeptoren CXCR4 (Abb. 4.11C, Abb. 4.12C) und CCR3 (Abb. 4.11D, Abb. 4.12D) zeigen wie auch bei den vorher beschriebenen Inkubationen keine wegweisenden Veränderungen im Vergleich zur Mediumkontrolle und keine auffallenden Unterschiede zwischen Nicht-Atopikern und Atopikern. HLA-DR (Abb. 4.11E, Abb. 4.12E) wird genauso wie Mannose- Rezeptor (Abb. 4.11F, Abb. 4.12F) bei beiden Gruppen eher vermehrt exprimiert, diese Ergebnisse sprechen auch mit denen der Inkubationen mit den anderen untersuchten TLR- Liganden überein.

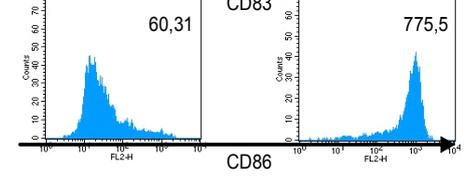
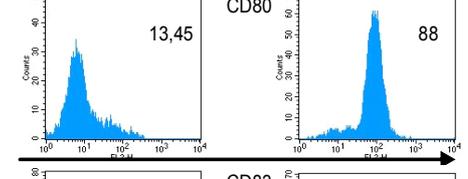
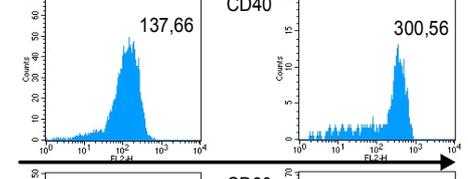
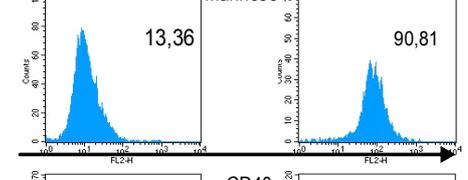
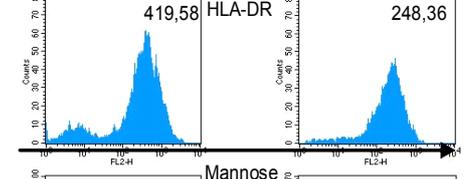
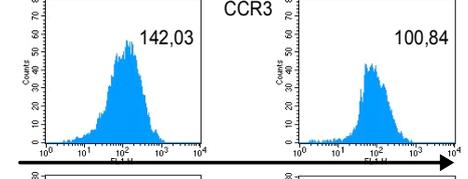
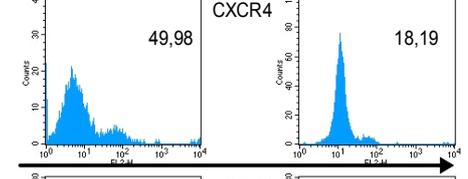
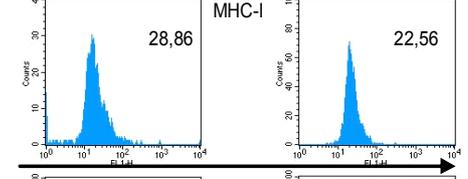
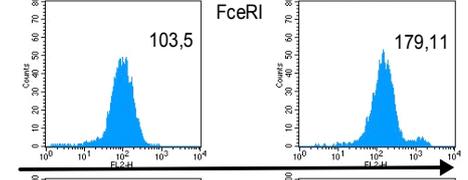
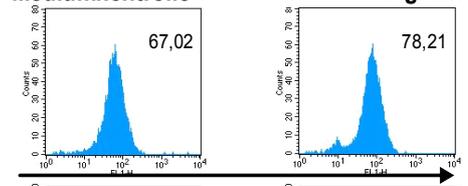
MHC I wird bei den Nicht- Atopikern nach Inkubation mit Flagellin hochreguliert (Mittelwert: Steigerung um 63%), bei den Atopikern wird MHC I runterreguliert (Mittelwert: Abfall um -31%). Dieser Unterschied ist tendenziell signifikant mit einem p-Wert von 0,055 (Abb. 4.11B, Abb. 4.12B).

Die Reifungsmarker CD40, CD80, CD83 und CD86 werden vermehrt exprimiert. Die Steigerung ist bei CD40 am niedrigsten (Abb. 4.11G, Abb. 4.12G), fällt allerdings bei den Nicht- Atopikern stärker aus als bei den Atopikern. Am stärksten wird CD86 exprimiert (Abb. 4.11J, Abb. 4.12J), bei allen drei CD80, CD83 (Abb. 4.11I, Abb. 4.12I) und CD86 legen die Atopiker deutlicher zu als die Nicht- Atopiker, bei CD80 mit einer tendenziellen Signifikanz. (p-Wert = 0,143, Abb. 4.11H, Abb. 4.12H). Die atopischen Zellen regulieren die Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 nach Stimulation mit PGN, Poly IC, LPS und Flagellin deutlicher hoch als die Zellen der gesunden Kontrollgruppe.

**Probandin JL (nicht-atop.)**  
**Mediumkontrolle** **Flagellin**

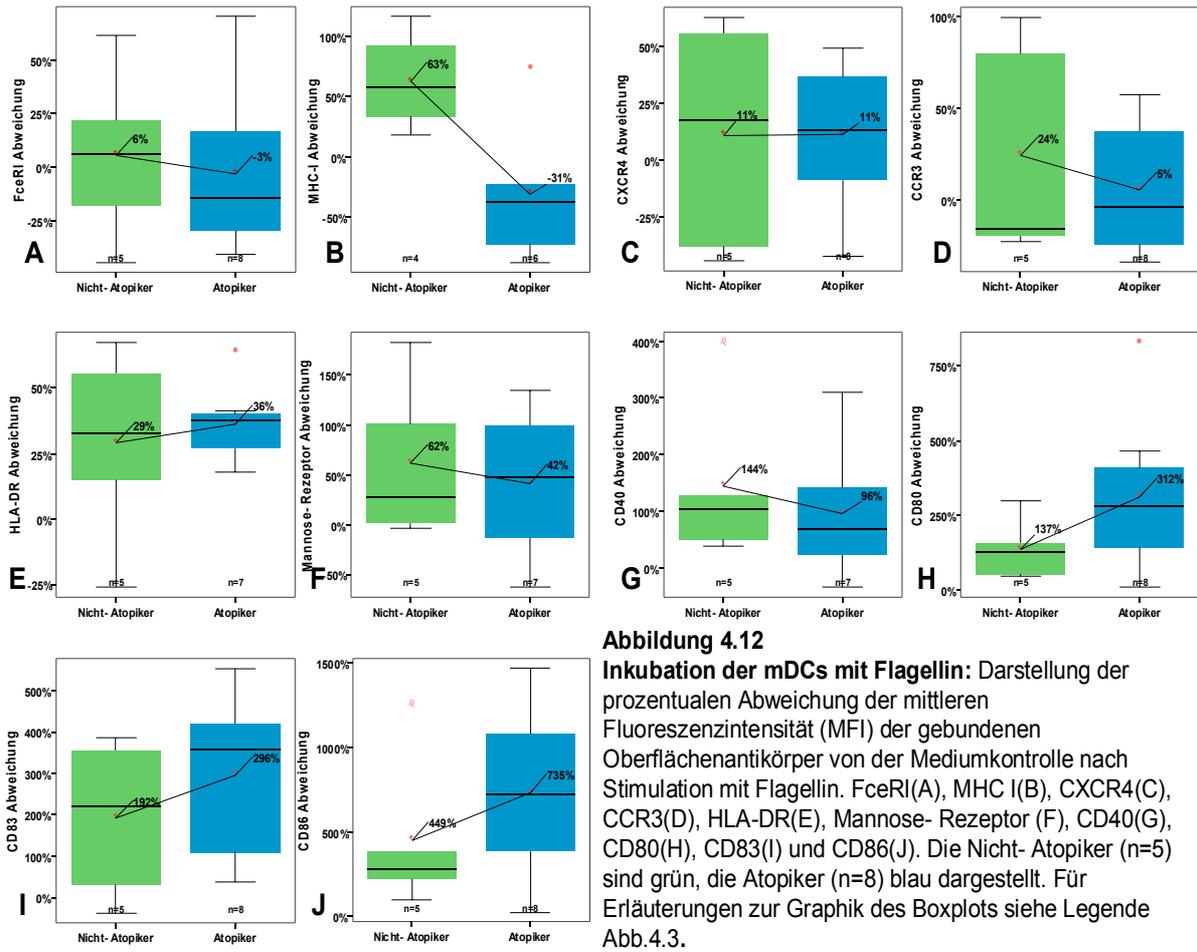


**Probandin JW (atop.)**  
**Mediumkontrolle** **Flagellin**



**Abbildung 4.11**

**Expressionsprofile von Oberflächenmolekülen nach Stimulation mit Flagellin (24h) auf dendritischen Zellen am siebten Tag nach Kultivierung, Vergleich mit der Mediumkontrolle, durchflusszytometrische Analyse. Linke Seite: Zellen eines nicht-atopischen Spenders, rechte Seite: Zellen eines atopischen Spenders. Die angegebenen Zahlen demonstrieren die Werte des Mittelwertes der Fluoreszenz (MFI) des Histogramms.**



**Abbildung 4.12**  
**Inkubation der mDCs mit Flagellin:** Darstellung der prozentualen Abweichung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der gebundenen Oberflächenantikörper von der Mediumkontrolle nach Stimulation mit Flagellin. FcεRI(A), MHC I(B), CXCR4(C), CCR3(D), HLA-DR(E), Mannose- Rezeptor (F), CD40(G), CD80(H), CD83(I) und CD86(J). Die Nicht- Atopiker (n=5) sind grün, die Atopiker (n=8) blau dargestellt. Für Erläuterungen zur Graphik des Boxplots siehe Legende Abb.4.3.

### **4.3.5 Stimulation mit CpG und Non- CpG**

Auch TLR9 erkennt wie TLR3 bestimmte Merkmale von Nucleinsäuren: TLR9 identifiziert unmethylierte CpG- Motive in Einzelstrang- DNA- Molekülen, die in bakterieller und viraler DNA häufig vorkommen. Das für diese Arbeit verwendete, synthetische Oligonukleotid enthält solche Abfolgen und stimuliert somit TLR9. Non CpG ("Control ODN") beinhaltet die gleichen Sequenzen wie CpG, jedoch sind die CpG Dinukleotide durch GpC Dinukleotide ersetzt worden. Non CpG stimuliert somit TLR9 nicht und der Einsatz einer solchen Kontrolle kann überprüfen, ob eine etwa hervorgerufene Stimulation bei CpG- Inkubation spezifisch ist.

Es finden sich keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen, den mit CpG bzw. Non CpG- stimulierten Zellen und der Mediumkontrolle (Abb. 4.13A-J, Abb. 4.14A-J). Dendritische Zellen, welche von Monozyten abgeleitet sind, lassen sich also nicht mit CpG stimulieren. Diese Ergebnisse werden gestützt von unseren PCR- Analysen, in denen TLR9 nur sehr schwach exprimiert wird.

### **4.3.6 Vergleich der Stimulationen**

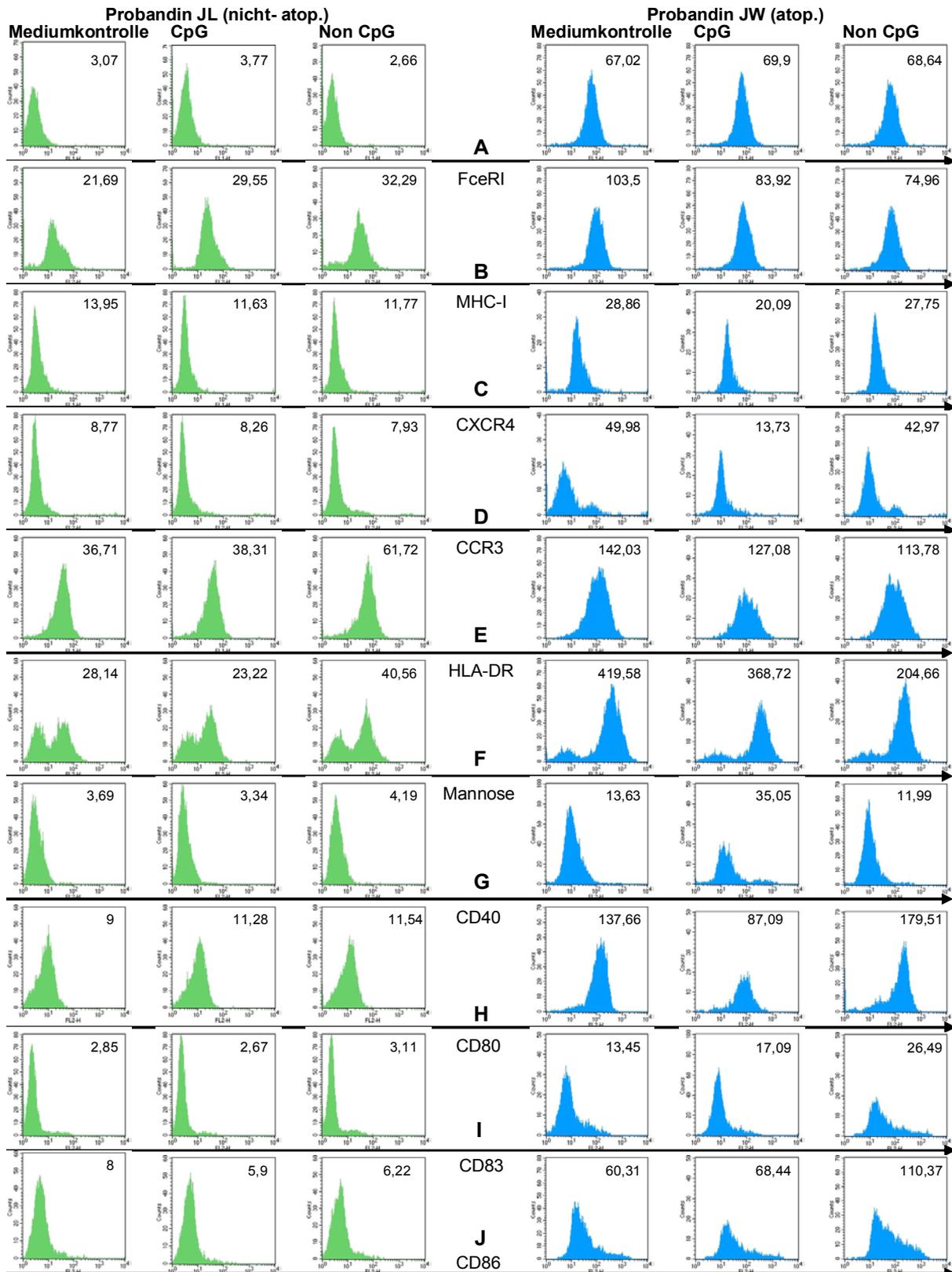
PGN, Poly IC, LPS und Flagellin führen zu Aktivierung und Reifung der mDCs. Die Inkubationen mit allen vier Stimulantien bewirkt die Induktion der Reifemarker CD40, CD80, CD83 und CD86. PGN induziert die Expression der Marker CD83 und CD86 am deutlichsten, es folgen Poly IC, LPS und Flagellin. Am stärksten wird die Expression der Marker CD40 und CD86 durch die Inkubation mit Poly IC induziert, es folgen PGN, LPS und Flagellin (CD80) bzw. LPS, Flagellin und PGN (CD40). Diese starke Aktivierung der mDCs durch Poly IC, dem TLR3- Liganden, korreliert nicht mit der eher moderaten Expression von TLR3 mRNA. Der TLR9- Ligand CpG und auch die Kontrolle Non CpG bewirken keine Aktivierung der mDCs, übereinstimmend mit der schwachen Expression von TLR9- mRNA.

Die Reaktion der mDCs hoch- atopischer Spender auf die TLR- Liganden war nicht reduziert und unterschied sich nur geringfügig von der Reaktion der Kontrollgruppe.

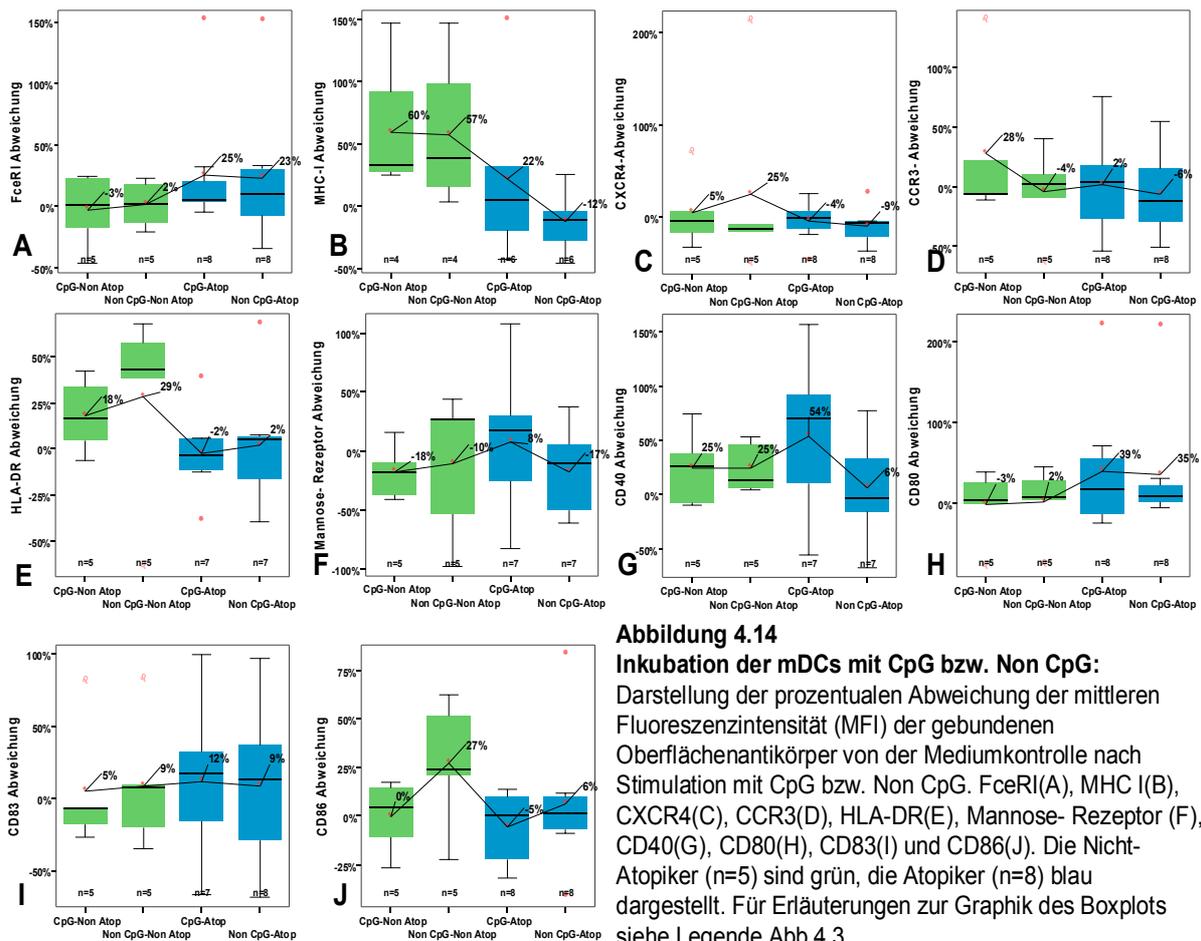
FcεRI und die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR3 werden nach Inkubation mit den TLR-Agonisten unverändert exprimiert. Der Mannose- Rezeptor wird bei beiden Gruppen von mDCs durch Aktivierung leicht hochreguliert.

Die antigenpräsentierenden Moleküle MHC-I und HLA-DR werden bei den Atopikern nach Aktivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe schwächer induziert.

Bei den Reifemarkern CD40, CD80, CD83 und CD86 zeigt die Gruppe der untersuchten atopischen mDCs eine stärkere Induktion im Vergleich zur nicht-atopischen Kontrollgruppe.



**Abbildung 4.13: Expressionsprofile von Oberflächenmolekülen nach Stimulation mit CpG/ Non CpG (24h) auf dendritischen Zellen am siebten Tag nach Kultivierung, Vergleich mit der Mediumkontrolle, durchflusszytometrische Analyse. Linke Seite: Zellen eines nicht-atopischen Spenders, rechte Seite: Zellen eines atopischen Spenders. Die angegebenen Zahlen demonstrieren die Werte des Mittelwertes der Fluoreszenz (MFI) des Histogramms.**



**Abbildung 4.14**

**Inkubation der mDCs mit CpG bzw. Non CpG:**

Darstellung der prozentualen Abweichung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der gebundenen Oberflächenantikörper von der Mediumkontrolle nach Stimulation mit CpG bzw. Non CpG. FcεRI(A), MHC I(B), CXCR4(C), CCR3(D), HLA-DR(E), Mannose- Rezeptor (F), CD40(G), CD80(H), CD83(I) und CD86(J). Die Nicht-Atopiker (n=5) sind grün, die Atopiker (n=8) blau dargestellt. Für Erläuterungen zur Graphik des Boxplots siehe Legende Abb.4.3.

#### 4.4 Nachweis der IL-12 und TNF- $\alpha$ Induktion auf Proteinebene

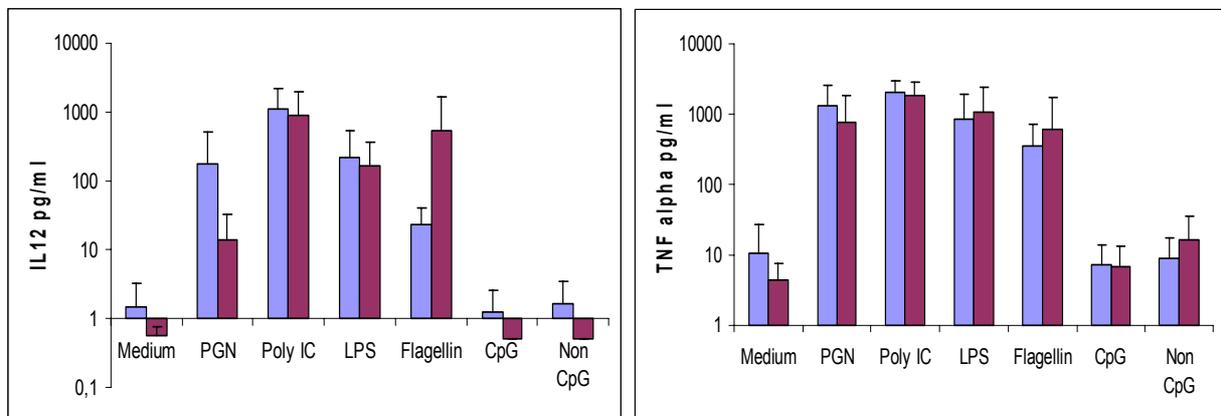
IL-12 und TNF- $\alpha$  wirken beide proinflammatorisch. IL-12 induziert ferner die Th1-Immunantwort. Wir untersuchten den Einfluss der TLR- Liganden auf die Zytokinsekretion und somit auf die Entscheidung zur Th1- oder Th2-Antwort.

Die gemessene Zytokinsekretion der unstimulierten, unreifen Zellen war sehr niedrig, häufig lag sie unter der Nachweisgrenze des Tests. Die atopischen Zellen sezernierten im Durchschnitt mehr Zytokine (Abb. 4.15).

Nach Inkubation mit PGN, Poly IC, LPS und Flagellin zeigte sich eine deutliche Induktion beider Zytokine. Und auch nach Stimulation sezernieren die Atopiker im Durchschnitt größere Mengen beider Zytokine im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der stärkste Induktor von sowohl IL-12 als auch TNF- $\alpha$  ist Poly IC. Dieses Ergebnis entspricht der starken Induktion von CD80, CD83 und CD86 nach Poly IC-Inkubation.

CpG und Non CpG bewirkten keine Induktion im Vergleich zur Negativkontrolle. Die fehlende Aktivierung der untersuchten mDCs durch CpG bestätigte die Ergebnisse der PCR und FACS- Analysen.



**Abbildung 4.15**

**Proteinquantifizierung von IL-12 und TNF- $\alpha$**  nach Inkubation mit verschiedenen TLR- Liganden für 24 h. Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 (Nicht- Atopiker, blau) bzw. 8 (Atopiker, rot) verschiedenen Experimenten.

## 4.5 Genetische Analyse

Um genetische Prädisposition als Ursache für unterschiedliche Immunantworten der Atopiker und der Kontrollgruppe auf TLR-Liganden auszuschließen, erfolgte eine Genotypisierung der TLR2 und TLR4 SNPs. Untersucht wurden htSNPs beider Gene sowie SNPs, von denen in der Literatur bereits Assoziationen mit Atopie beschrieben wurden (Eder et al., 2004; Ahmad-Nejad et al., 2004; Fageras Bottcher et al., 2004). In einer großen Kohortenstudie mit atopischen Eltern-Kind-Trios wurden mögliche Risiko- Polymorphismen evaluiert, mit denen wir die Genotypen unserer Probanden verglichen. Bei den beiden Probandengruppen fand sich kein Unterschied im Allel- oder Genotyp. Diese Ergebnisse entsprechen einer fehlenden Assoziation mit Atopie in der Familienstudie (Weidinger et al., 2006). Genetische Polymorphismen sind also nicht verantwortlich für die beobachteten Unterschiede in der Immunantwort atopischer und nicht- atopischer Probanden gegen PGN und LPS.

Die stärkste Induktion von TNF- $\alpha$  and IL-12 erfolgte in beiden Gruppen nach Inkubation mit Poly IC, einem Liganden für TLR3. Die Rolle der TLR3 Polymorphismen wurde durch Analyse von htSNPs in unseren Probanden und 275 Eltern-Kind-Trios beleuchtet. Die mittlere Erfolgsrate der Genotypisierung für die verschiedenen TLR3 Polymorphismen lag bei 96,7%.

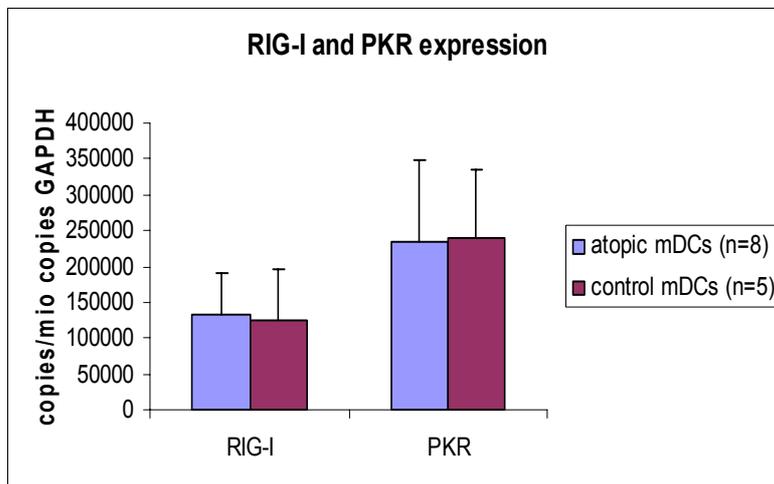
Zwischen den verschiedenen SNPs und dem atopischen Ekzem zeigte sich keine Assoziation. Die ausgewählten TLR3 SNPs stehen in starkem „linkage disequilibrium“ zueinander und schufen so Unterscheidungsmöglichkeiten von 98,5% der beobachteten Haplotypen des Gens.

Auch die detaillierte Analyse der Untergruppen der Eltern-Kind-Trios der Kinder mit Asthma, Rhinitis, anderen allergischen Erkrankungen, sowie mit einem erhöhten Gesamt-IgE zeigte keine Assoziationen mit TLR3 Polymorphismen.

## 4.6 Nachweis der Expression von PKR und RIG-I

Neben TLR3 steuern weitere Moleküle die Erkennung des dsRNA Äquivalent Poly IC, nämlich PKR und RIG-I, welche beide zu einer Translokation von IRF3 und NF kappa B führen. Bei einer starken Entzündungsantwort der mDCs auf Poly IC und einer nur moderaten Expression von TLR3, haben wir nach weiteren Poly IC Rezeptoren gesucht. RIG-I und PKR werden auf einem hohen Level in beiden Gruppen exprimiert (Abb. 4.16).

Zwischen beiden Gruppen zeigt sich kein Unterschied. Da TLR3 mit der Taqman Technik nachgewiesen wurde, für RIG-I und PKR allerdings die SYBR® Green Technik verwandt wurde, konnten wir die 3 Expressionen nicht direkt miteinander vergleichen.



**Abbildung 4.16**

**Real Time PCR zum Nachweis von RIG-I und PKR.**

Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 6 (Nicht-Atopiker- A) bzw. 7 (Atopiker- B) verschiedenen Experimenten dargestellt.

## 5 Diskussion

Toll-like-Rezeptor Agonisten fungieren als Immunomodulatoren, welche die Immunantwort in Richtung eines Th1-Phänotyps beeinflussen können. Im Rahmen der einzigen kausalen Therapie der Typ I Allergien, der spezifischen Immuntherapie, werden deshalb Allergene mit TLR-Liganden kombiniert (Mothes et al., 2003; Vollmer, 2005; Puggioni et al., 2005). Dendritische Zellen spielen in der durch SIT hervorgerufenen Immunantwort eine wichtige Rolle.

Die vorgelegte Arbeit vergleicht die Immunantwort mDCs hochatopischer Spender (Gesamt-IgE über 1000 IU/ml) sowie einer gesunden Kontrollgruppe (Gesamt-IgE unter 70 IU/ml) auf TLR-Liganden. Die Patienten, welche sich für ein SIT-Protokoll qualifizieren, haben eine atopische Disposition. Neben einem besseren Verständnis des SIT-Wirkungsmechanismus setzten wir uns die Identifikation weiterer möglicher Adjuvanzen für SIT-Protokolle zum Ziel.

Die Zellen wurden auf die konstitutive TLR-Expression und die Funktionalität der Rezeptoren untersucht. Hierzu wurden Oberflächenmarkerexpression und Zytokinausschüttung der Zellen nach Inkubation mit ausgewählten TLR-Liganden analysiert. Um mögliche genetische Grundlagen für unterschiedliche Immunantworten darzustellen, wurden die Ergebnisse der genetischen Assoziationsanalyse von single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TLR-Genen mit den Befunden der funktionalen Experimente korreliert.

MDCs wurden untersucht, da sie den Hauptanteil der DCs in der Haut von Patienten mit atopischem Ekzem ausmachen (Novak und Bieber, 2005), die Verteilung im Blut ist dahingegen noch ungeklärt (Haszhizume et al., 2005).

Die in dieser Arbeit aus Monozyten *in vitro* gewonnenen mDCs entsprachen unreifen mDCs (Banchereau und Steinman, 1998).

Der stellvertretend für die Endozytoserezeptoren untersuchte Mannose-Rezeptor war der am stärksten exprimierte Marker dieser unreifen mDCs. Somit sind die Zellen für ihre Hauptaufgabe, die Antigenaufnahme, gut ausgestattet. Die kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD40, CD80, CD83 und CD86 und die antigenpräsentierenden MHC-I und HLA-DR wurden nicht bis kaum nachgewiesen. Die unreifen

dendritischen Zellen wirken somit, wie zuvor beschrieben, nicht kostimulatorisch und antigenpräsentierend auf T- Zellen.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass in der basalen Expression von Oberflächenmarkern kein Unterschied zwischen den zwei Gruppen besteht. Die Atopiker weisen keine eingeschränkte oder veränderte Ausstattung an Oberflächenmarkern der unreifen mDCs im Vergleich zu den mDCs der gesunden Kontrollgruppe auf.

Weder bei den unstimulierten mDCs der Atopiker noch bei denen der Nicht-Atopiker konnte eine signifikante Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR3 nachgewiesen werden. Die Expression veränderte sich nicht nach Stimulation mit TLR-Liganden und der dadurch induzierten Reifung der mDCs.

Chemokinrezeptoren spielen eine Rolle in der Aufnahme von Antigenen und der Präsentation der Antigen signale. Sie initiieren adaptive Immunantworten, indem sie die Fortbewegung von unreifen und auch aktivierten DCs dirigieren (Oppenheim et al., 2002). Die Chemokin-Rezeptorinteraktion steuert die Entscheidung der DCs zu einer humoralen oder zellulären Antwort. Auch die Form der T-Helferantwort wird beeinflusst (Biragyn et al., 2001). Aus unseren Ergebnissen geht hervor, dass CXCR4 und CCR3 für mDCs keine dieser Funktionen wahrnehmen.

Die Expression des hochaffinen IgE- Rezeptors FcεRI 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). Für mDCs wurde die nicht konstitutive, variable Expression des FcεRI beschrieben (Kraft et al., 2002)

FcεRI-exprimierende, antigenpräsentierende Zellen spielen eine wichtige Rolle bei IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ im Rahmen von atopischen Krankheiten (Kraft et al., 2002; Novak und Bieber, 2005). So wird beschrieben, dass die FcεRI-Expression auf Langerhans-Zellen bei Patienten mit atopischem Ekzem im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe verstärkt ist (Bieber, 1997; Reich et al., 2001).

Wir konnten auch bei unseren atopischen Probanden die erhöhte Expression in bestimmten Fällen nachweisen, jedoch zeigte sich eine sehr große Variabilität in der Ausprägung dieses Oberflächenmarkers bei den untersuchten Stichproben von 8

Atopikern und 5 Nicht-Atopikern (Abb. 4.3.A). So konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression des hoch affinen IgE-Rezeptors (FcεRI) zwischen den beiden untersuchten Gruppen nachgewiesen werden, weder bei den unstimulierten Zellen noch bei den gereiften Zellen nach TLR-Stimulation. Die TLR-Liganden induzierte Reifung der mDCs bewirkte somit keine Änderung in der Expression des FcεRI.

Als eine mögliche Erklärung haben wir und andere Arbeitsgruppen beobachtet, dass mDCs für die Expression dieses Rezeptors TGF-β benötigen, da sie sich so zu einem, den Langerhans-Zellen ähnlichen, Phänotyp entwickeln (Geissmann et al., 1998). Mit IL-4 und GM-CSF, aber ohne TGF-β, kultivierte mDCs sind nicht in der Lage, FcεRI in großer Quantität zu exprimieren.

Unsere Untersuchungen mit mDCs repräsentieren folglich nicht die komplette DC-Population in der Haut. Hyposensibilisierungsspritzen werden jedoch normalerweise subkutan in tiefere Lagen der Haut appliziert. Dort spielen DCs, und nicht Langerhans Zellen, eine wichtige Rolle.

MDCs atopischer und nicht-atopischer Probanden exprimieren eine breite Palette von TLRs, v.a. Typ I TLRs wie TLR 2, 4, 5 und 6. Diese erkennen ihre Liganden an der Zelloberfläche und leiten das Signal über das Adaptermolekül MyD88 an NF kappa B weiter (Hemmi et al., 2005).

In den von uns untersuchten Zellen wurde TLR2 am stärksten exprimiert, gefolgt von TLR6, TLR4, TLR5 und TLR8. TLR1 und TLR3 wurden weniger stark exprimiert. TLR7, TLR10 und TLR9 waren nicht bis kaum nachweisbar. Atopische und nicht-atopische mDCs hatten vergleichbare Expressionsmuster, wobei die atopischen Zellen quantitativ mehr mRNA exprimierten als die Zellen der Kontrollgruppe, signifikant bei TLR5.

Diese enorme Bandbreite an TLRs bei mDCs wurde bereits bestätigt, ebenso die sehr schwache Expression von TLR7 und 9 (Kadowaki et al., 2001; Jarrosay et al., 2001; Colonna et al., 2002). Kadowaki et al. konnten TLR4 nicht auf mDCs nachweisen, andere Studien stimmen aber mit unserem Nachweis von TLR4 auf mDCs überein (Kadowaki et al., 2001; Takeuchi et al., 2003). Auch der Nachweis auf Proteinebene mit monoklonalen Antikörpern zeigte, dass TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 und TLR6 von mDCs exprimiert werden (Seya et al., 2005).

Nach Stimulation mit LPS, PGN, Flagellin und Poly IC beobachteten wir und andere Arbeitsgruppen in atopischen mDCs eine stärkere Hochregulierung der kostimulatorischen Reifemarker CD80, CD83 und CD86 als in den mDCs der Kontrollgruppe. Die Interaktion zwischen CD80 bzw. CD86 mit CD28 der T-Zellen ist ein Signal, welches für die Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen essentiell ist. Die antigenpräsentierenden MHC-I- und II-Moleküle hingegen wurden im Vergleich zu den mDCs der atopischen Probanden vermehrt in den mDCs der gesunden Kontrollgruppe induziert (Chen et al., 2005). Der T-Zellrezeptor bindet während der Antigenpräsentation mit seiner mittleren hochvariablen, sog. CDR3-Region das Antigen und die polymorphen Anteile des MHC-Moleküls. Das CD4+ Molekül bindet an die monomorphen Teile des MHC-II-Moleküls und dient der Stabilisierung der Interaktion. Diese DC- und diese DC- und T-Zellinteraktion stellen ein weiteres Signal der T-Zellaktivierung dar.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- $\alpha$  wurden in beiden Gruppen in vergleichbaren Mengen produziert. Diese Zytokine stellen das dritte Signal dar, welches für die Differenzierung von Th-Zellen zu Th1-Effektorzellen notwendig ist. Essentiell für die Polarisierung zu Th1-Effektorzellen ist IL-12, welches von aktivierten DCs in den T-Zellarealen sezerniert wird.

TLR-Liganden sind also geeignete Adjuvantien in Desensibilisierungsprotokollen. Je nach ausgewähltem Liganden kann eine unterschiedlich starke proinflammatorische Antwort in den kultivierte DCs induziert werden.

TLR2-Ligand PGN bewirkte eine starke Induktion von Oberflächenmarkern und Zytokinen (Takeuchi et al., 2003; Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001). Auch TLR4-Ligand LPS und TLR5-Ligand Flagellin induzierten eine Reifung der mDCs mit Sekretion von Zytokinen, wie bereits in der Literatur beschrieben (Takeuchi et al., 2003; Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001; Pietila et al., 2005).

Der stärkste Induktor von sowohl IL-12 als auch TNF- $\alpha$  ist TLR3-Ligand Poly IC. Dieses Ergebnis korreliert mit der starken Induktion von CD80, CD83 und CD86 nach Poly IC- Inkubation. Ähnliche Ergebnisse sind in der Literatur beschrieben (Kadowaki et al., 2001).

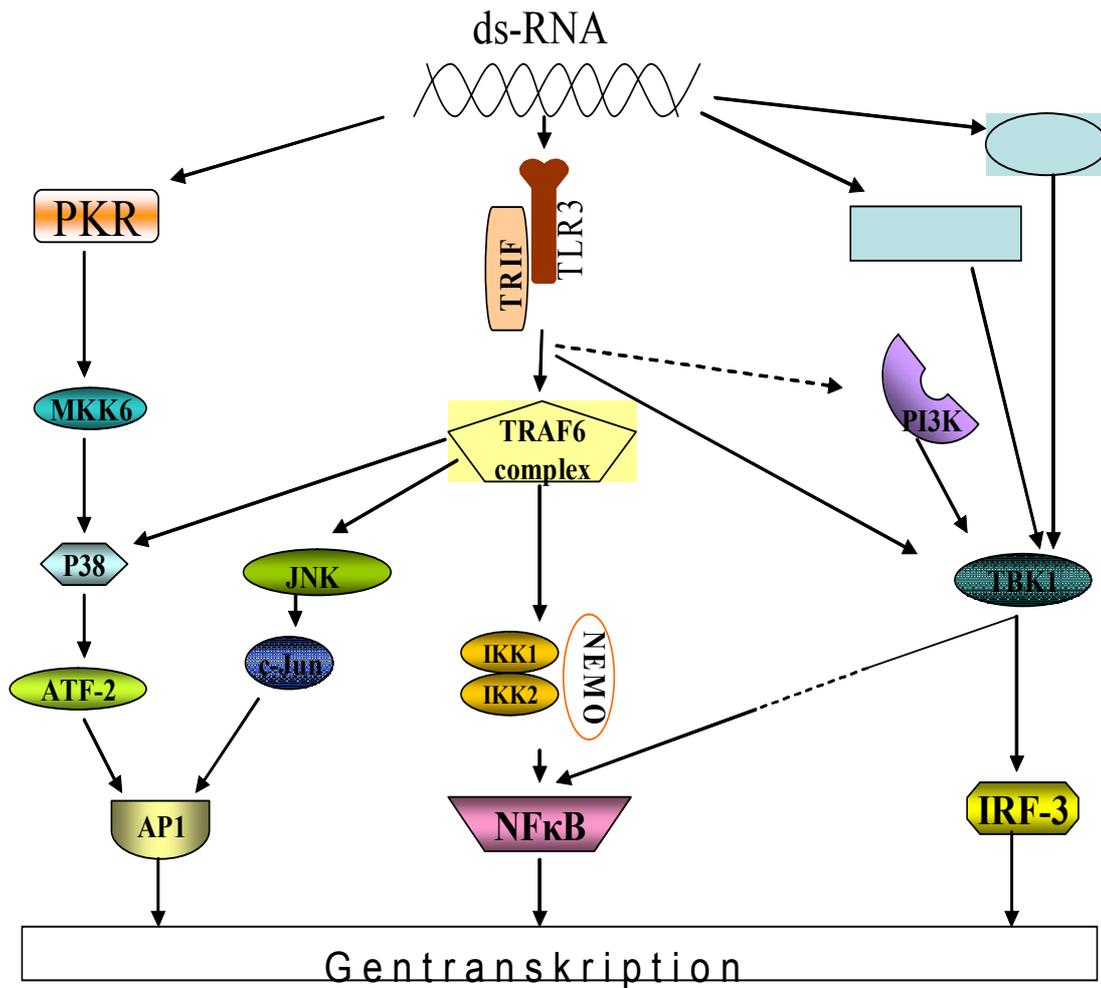
TLR3 wird jedoch auf niedrigerem Niveau exprimiert als TLR2, TLR4 und TLR5. Der TLR3-Ligand doppelsträngige RNA ist ein Zwischenprodukt bei der Virusreplikation und befindet sich in der Zelle. Der Signaltransduktionsmechanismus für dsRNA und

das synthetische Äquivalent Poly IC führt zu einer verstärkten Produktion von antiviralem Typ-I-Interferon durch die Aktivierung der Adaptermoleküle TRIF und TBK1, was zu einer Aktivierung der wichtigen Transkriptionsfaktoren IRF3/IRF7 führt (Jiang et al., 2003, Abb. 5.1).

Studien über die Induktion von IL-12 (p35 und p40) in menschlichen mDCs haben gezeigt, dass IRF-3 zu einer verstärkten IL-12 Transkription führen kann (Goriely et al., 2006). Die Phosphorylierung von TRAF6, einem Adapterprotein, welches zu einer nuklearen Translokation der aktiven Untereinheiten p65 und p50 von NF $\kappa$ B führt, stellt eine Erklärung für die TNF- $\alpha$  Produktion dar (Jiang et al., 2004).

Neben TLR3 sind andere Moleküle bekannt, welche durch doppelsträngige RNA aktiviert werden und die Produktion von Oberflächenmarkern und Zytokinen induzieren. Diese sind das Retinoid-induzierende Gen (RIG)-I, welches über TBK1 zur Translokation von IRF-3 führt, und die Proteinkinase R (PKR), welches AP-1 Transkriptionsfaktor aktiviert (Sen und Sarkar, 2005; Silva et al, 2004; Abb. 5.1). RIG-I und PKR werden in großen Mengen in DCs exprimiert und sind relevant für die Induktion von IL-12 in diesem Zelltyp. Die starke Induktion der Th1-Zytokine IL-12 und TNF $\alpha$  durch Poly IC reflektiert also die Signaltransduktion durch verschiedene Rezeptoren, welche NF $\kappa$ B und IRF-3 aktivieren. Poly IC wurde bis jetzt noch nicht als Bestandteil von Desensibilisierungslösungen verwendet, entsprechend unserer Ergebnisse wäre es jedoch ein interessantes Adjuvanz.

Die einzige kausale Therapie für Atopiker stellt die spezifische Immuntherapie dar. Unter der SIT oder Hypo-/Desensibilisierung versteht man die wiederholte Applikation von zunehmenden Mengen des relevanten Allergens, um die Symptome bei Allergenexposition zu mildern (Ring, 2004). Der wesentliche Wirkungsmechanismus der SIT ist die Korrektur des fehlgeleiteten Immunsystems von der Th2- zur gewünschten Th1-Reaktion (Durham et al., 1999). Die Hauptnachteile der SIT sind die lange, kostenintensive Behandlungszeiten mit damit verbundenen zahlreichen Injektionen; außerdem besteht das Risiko von schweren anaphylaktischen Reaktionen (Johansen et al., 2005). Es ist also von großem



**Abbildung 5.1**

**DsRNA- Signaltransduktionswege.** 3 Signaltransduktionswege wurden beschrieben, welche zu der durch dsRNA vermittelten Geninduktion führen. Der TLR3/TRIF- Signalweg aktiviert NFκB, IRF-3 und AP1 über den TRAF6-Komplex und TBK1. DsRNA bindet auch an die RNA Helikasen RIG-I und mda-5 und aktiviert so wiederum, vermittelt über TBK1, IRF-3 und NFκB. Wenn dsRNA an PKR bindet, wird MAP kinase kinase 6 (MKK6) aktiviert und dadurch die AP-1 Transkriptionsfaktoren.

Interesse, sowohl die Anzahl der benötigten Injektionen zu verringern und somit den Behandlungszeitraum zu verkürzen, als auch die Nebenwirkungen zu vermindern und die SIT so sicherer und kontrollierbarer zu machen.

Ein Ansatzpunkt dafür ist das Beimischen von Adjuvanzen oder so genannten Immune Response Modifiers (IRMs) zur Injektionslösung.

Im Gegensatz zu dsRNA und dem Äquivalent Poly IC werden TLR-Liganden Monophosphoryl Lipid A (MPLA), ein LPS- Derivat, und CpG-DNA bereits in der Praxis eingesetzt oder in klinischen Studien evaluiert (Drachenberg et al., 2001; Broide, 2005).

MDCs sind in der Lage, TLR4 zu exprimieren, und TLR4-Ligand LPS, die Ursprungssubstanz von MPLA, induziert die DC-Reifung und die Produktion von Th1-Zytokinen. Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigen mDCs atopischer Probanden eine gleichrangige Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-12 und eine stärkere Expression kostimulatorischer Oberflächenmarker. Unsere Ergebnisse erklären die Wirkungsweise von MPLA und entsprechen der guten klinischen Erfahrung mit MPLA bei atopischen Patienten.

CpG-DNA, ein weiteres, bereits etabliertes SIT- Adjuvanz, entfaltet seine Wirkung nicht über mDCs. TLR9 wird in mDCs nicht exprimiert, und so führten der TLR9-Ligand CpG und auch die Kontrolle Non CpG zu keiner Aktivierung der mDCs. Unsere Ergebnisse über TLR9 stimmen mit anderen Studien an menschlichen und bovinen mDCs überein (Hartmann et al., 1999; Hartmann und Krieg, 1999; Bauer et al., 2001a und b; Kadowaki et al., 2001; Werling et al., 2004).

CpG-DNA als Adjuvanz in SIT-Protokollen wirkt über plasmazytoide DCs und B-Zellen, beide exprimieren TLR9 und reagieren auf CpG-DNA (Kadowaki et al., 2001; Kusunoki et al., 2005).

CpG-DNA führt zur Induktion von Typ-I-Interferonen in pDCs. Die Rolle der Typ-I-Interferone in der Umstellung der Th2-dominierten Immunantwort von atopischen Patienten ist noch ungeklärt.

In B-Zellen jedoch führt CpG-DNA zu einer Hemmung der IgE-Synthese, was bei der SIT auch zu der gewünschten protektiven Immunantwort führt (Kusunoki et al., 2005). Der größte Teil der Wirkung von CpG-DNA in SIT-Protokollen scheint also B-Zell vermittelt zu sein.

Um zu erkennen, ob verschiedene Polymorphismen der TLR-Gene für die Unterschiede in der Immunantwort zwischen den beiden Gruppen verantwortlich sind, wurden bei allen Probanden die SNPs innerhalb der TLR 2-, 3-, und 4- Gene untersucht.

Polymorphismen in TLR- Genen sind mit atopischen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden. Verschiedene Polymorphismen wurden als Erklärung für eine weniger ausgeprägte Th1-Antwort gegen mikrobielle Antigene und die Neigung zur Th2-Antwort verwendet (Ahmad-Nejad et al., 2004; Fageras Bottcher et al., 2004; Werner et al., 2003).

Eder et al. berichten, dass ein Polymorphismus im TLR2-Gen, TLR2/-16934, mit Umweltfaktoren, und zwar der Herkunft vom Bauernhof interagiert. So sollen genetische Variationen im TLR2-Gen ein entscheidender Faktor für die Anfälligkeit für Asthma und Allergien bei Bauernkindern sein. Dies gilt jedoch nicht für Kinder, welche aus derselben ländlichen Gegend stammen, aber nicht auf Bauernhöfen leben (Eder et al., 2005).

Der TLR2 R753Q Polymorphismus hingegen ist mit einer Untergruppe von Patienten mit besonders schwerem atopischen Ekzem assoziiert. Dieser Polymorphismus erhöht die Anfälligkeit für Infektionen und Besiedlung mit verschiedenen Pathogenen wie *S. aureus*. Ferner findet sich bei Patienten mit diesem Polymorphismus ein erhöhter IgE- Serumspiegel (Ahmad-Nejad et al., 2004)

Keine Assoziation wurde gefunden zwischen Patienten mit atopischem Ekzem und verschiedenen TLR4 Polymorphismen (Ahmad-Nejad et al., 2004). Auch zwischen Patienten mit Asthma oder anderen atopischen Phänotypen bestehen keine Verknüpfungen zu TLR4- Polymorphismen (Raby et al., 2002).

Werner et al. aber haben einen nicht signifikanten Trend zu einem geringeren Risiko für Asthma unter den TLR-4 D299G/T399I- Trägern gefunden. Die Träger des Polymorphismus zeigen eine veränderte Antwort auf Endotoxin (Werner et al., 2003).

Wir haben Assoziationen zwischen Phänotypen, SNPs und Haplotypen innerhalb der TLR2 und TLR4 Gene untersucht und keine Genotypenpräferenz gefunden. Da die Anzahl der untersuchten Individuen sehr gering war, haben wir diese Ergebnisse mit einer größeren Kohorte von Eltern-Kind-Trios verglichen, welche ebenfalls keine Assoziation mit atopischen Phänotypen zeigte (Weidinger et al., 2006).

Genetische Abweichungen der SNPs in den relevanten Genen sind also nicht verantwortlich für die unterschiedlichen Immunantworten der atopischen und gesunden Gruppen.

Das TLR3-Gen haben wir genauer geprüft. Wir haben SNPs und Haplotypen untersucht und die SNP-Untersuchung auf eine große Familienkohorte ausgedehnt. Dadurch konnte die Möglichkeit von falschen Assoziationen durch Populationsstratifizierung verhindert werden. Weder bei unseren Probanden noch in der Familienstudie zeigten sich signifikante Assoziationen von TLR3-Varianten mit atopischen Zügen.

Zusammenfassend konnten wir keine besondere Assoziation von Polymorphismen innerhalb der TLR2, 3 und 4 Gene in unseren Probanden finden, was unseren Beobachtungen in der größeren Kohorte mit ausreichender statistischer Aussagekraft entspricht.

Die Gene von TLR2, 3 und 4 stellen also keine prädisponierenden Loci für das atopische Ekzem in der deutschen, weißen Bevölkerung dar. Außerdem sind sie nicht verantwortlich für unterschiedliche Immunantworten mDCs atopischer und gesunder Spender.

In dieser Arbeit wurde erstmals die konstitutive TLR-Expression mDCs atopischer und nicht-atopischer Spender miteinander verglichen. Beide Gruppen zeigten ähnliche Expressionsmuster, wobei die Atopiker quantitativ mehr TLRs exprimieren. Ferner wurde die Reaktion mDCs beider Gruppen auf TLR-Liganden bezüglich der Oberflächenmarkerexpression und der Zytokinsekretion analysiert. Die Atopiker zeigten keine gestörte Immunantwort gegenüber TLR-Liganden, sondern reagierten teilweise sogar stärker als die gesunde Kontrollgruppe. Unterschiede waren gering und schienen Liganden-abhängig. Gesunde Individuen regulierten MHC-Moleküle stärker hoch, atopische DCs exprimierten kostimulatorische Moleküle stärker.

Die ausgewählten TLR-Liganden PGN, Poly IC, LPS und Flagellin bewirkten bei den mDCs der hoch-atopischen Spender eine Induktion der Th1-Antwort.

Neben den bereits etablierten Adjuvantien MPLA und CpG-DNA sollten auch Poly IC, PGN und Flagellin als mögliche Verstärker einer Th1-Induktion im Rahmen von SIT-Protokollen in Betracht gezogen werden. Weiterführende Untersuchungen werden das wichtige Ziel haben, diese Adjuvantien weiter zu evaluieren und zu entwickeln.

## 6 Literaturverzeichnis

Aderem, A., Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.

Ahmad-Nejad, P., Mrabet-Dahbi, S., Breuer, K., Klotz, M., Werfel, T., Herz, U., Heeg, K., Neumaier, M., Renz, H. (2004). The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 113, 565-567.

Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B., Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 102, 98-106.

Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C.B., Blaser, K., Akdis, C.A. (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 199, 1567-1575.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 732-738.

Amlie-Lefond, C., Paz, D.A., Connelly, M.P., Huffnagle, G.B., Dunn, K.S., Whelan, N.T., Whelan, H.T. (2005). Innate immunity for biodefense: a strategy whose time has come. *J Allergy Clin Immunol* 116, 1334-1342.

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

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A., Calderwood, S.K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277, 15028-15034.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:, 767-811.

Barchet, W., Cella, M., Colonna, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells - virus expert of innate immunity. *Semin Immunol* 17, 253-261.

Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J.W., Scherer, B., Kremer, J.P., Wagner, H., Lipford, G.B. (2001a). Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 166, 5000-5007.

Bauer, S., Kirschning, C.J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., Lipford, G.B. (2001b). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:, 9237-9242.

Bieber, T., Dannenberg, B., Prinz, J. C., Rieber, E. P., Stolz, W., Braun-Falco, O., Ring, J. (1989). Occurrence of IgE-bearing epidermal Langerhans cells in atopic eczema: a study of the time course of the lesions and with regard to the IgE serum level. *J Invest Dermatol* 93, 215-219.

Bieber, T., de la Salle, H., Wollenberg, A., Hakimi, J., Chizzonite, R., Ring, J., Hanau, D., de la Salle, C. (1992). Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FceRI). *J Exp Med* 175, 1285-1290.

Bieber, T. (1997). FceRI- expressing antigen- presenting cells: new players in the atopic game. *Immunol Today* 18, 311-313.

Biragyn, A., Surehnu, M. Yang, D., Ruffini, P.A., Haines, B.A., KLyushenkova, E., Oppenheim, J.J., Kwak, L.W. (2001). Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with non- immunogenic target antigens. *J Immunol* 167, 6644-6653.

Black, C. M., Catterall, J. R., Remington, J. S. (1987). In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J Immunol* 138, 491-495.

Blaser, K., Carballido, J.M., Faith, A., Cramer, R., Akdis, C.A. (1998). Determinants and mechanisms of human immune response to bee venom phospholipase A2. *Int Arch Allergy Immunol* 117, 1-10.

Brigl, M., Brenner, M.B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22, 817-890.

Broide, D. H. (2005). Immunostimulatory sequences of DNA and conjugates in the treatment of allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 5, 182-185.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180, 1263-1272.

Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782-787.

Chandra, R. K., Baker, M. (1983). Numerical and functional deficiency of suppressor T cells precedes development of atopic eczema. *Lancet* 11, 1393-1394.

- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., Gluckman, J.C. (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 27, 431-441.
- Chen, X. Q., Yang, J., Hu, S. P., Nie, H. X., Mao, G. Y., Chen, H. B. (2005). Increased Expression of CD86 and Reduced Production of IL-12 and IL-10 by Monocyte-Derived Dendritic Cells from Allergic Asthmatics and Their Effects on Th1- and Th2-Type Cytokine Balance. *Respiration*.
- Chuang, T., Ulevitch, R.J. (2001). Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 1518, 157-161.
- Colonna, M., Krug, A., Cella, M. (2002). Interferon- producing cells. on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* 14, 373-379.
- Coombs, R. R. A., Gell, P.G.H. (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. In *Clinical Aspects of Immunology*, P. G. H. Gell, Coombs, R.R.A., ed. (Philadelphia, Davis), pp. 317.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Drachenberg, K. J., Wheeler, A.W., Stuebner, P., Horak, F. (2001). A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy* 56, 498-505.
- Durham, S. R., Walker, S. M., Varga, E. M., Jacobson, M. R., O'Brien, F., Noble, W., Till, S. J., Hamid, Q. A., Nouri-Aria, K. T. (1999). Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 341, 468-475.
- Eder, W., Klimecki, W., Yu, L., von Mutius, E., Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Nowak, D., Martinez, F. D. (2004). Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 113, 482-488.
- Fageras Bottcher, M., Hmani-Aifa, M., Lindstrom, A., Jenmalm, M. C., Mai, X. M., Nilsson, L., Zdolsek, H. A., Bjorksten, B., Soderkvist, P., Vaarala, O. (2004). A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 114, 561-567.
- Francis, J. N., Durham, S. R. (2004). Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4, 543-548.

Fraser, I. P., Koziel, H., Ezekowitz, R.A. (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 10, 363-372.

Freeman, E. J. (1914). Vaccination against hay fever. *Lancet* I, 1178.

Fujita, H., Asahina, A., Sugaya, M., Nakamura, K., Gao, P., Fujiwara, H., Tamaki, K. (2005). Differential production of Th1- and Th2-type chemokines by mouse Langerhans cells and splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol* 124, 343-350.

Gangloff, S. C., Guenounou, M. (2004). Toll-like receptors and immune response in allergic disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 26, 115-125.

Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J.P., Dy, M., Brousse, N., Hermine, O. (1998). Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans Cells. *J Exp Med* 188, 961-966.

Goriely, S., Molle, C., Nguyen, M., Albarani, V., Haddou, N. O., Lin, R., De Wit, D., Flamand, V., Willems, F., Goldman, M. (2006). Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood* 107, 1078-1084.

Grewe, M., Walther, S., Gyufko, K., Czech, W., Schöpf, E., Krutmann, J. (1995). Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 105, 407-410.

Grouard, G., Rissoan, M.C., Figueira, L., Durand, I., Banchereau, J., Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with IL-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185, 1101-1111.

Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., Nakano, H., (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189, 451-460.

Hanifin, J. M., Rajka, G. (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 92, 44-47.

Hartmann, G., Krieg, A.M. (1999). CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther* 6, 893-903.

Hartmann, G., Weiner, G.J., Krieg, A.M. (1999). CpG DNA: a potent signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9305.

Hashimoto, C., Hudson, K. L., Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

Hashizume, H., Horibe, T., Yagi, H., Seo, N., Takigawa, M. (2005). Compartmental imbalance and aberrant immune function of blood CD123<sup>+</sup> (plasmacytoid) and CD11c<sup>+</sup> (myeloid) dendritic cells in atopic dermatitis. *J Immunol* 174, 2396-2403.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.

Haynes, L. M., Moore, D.D., Kurt-Jones, E.A., Finberg, R.W., Anderson, L.J., Tripp, R.A. (2001). Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol* 75, 10730-10737.

Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., Bauer, S. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 33, 2987-2997.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.

Hemmi, H., Akira, S. (2005). TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy* 86, 120-135.

Herz, U., Bunikowski, R., Renz, H. (1998). Role of T cells in atopic dermatitis. New aspects on the dynamics of cytokine production and the contribution of bacterial superantigens. *Int Arch Allergy Immunol* 115, 179-190.

Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., E., A., Steinman, R. M., Romani, N., Schuler, G. (1996). Interleukin- 12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 26, 659-668.

Hilkens, C. M., Kalinski, P., de Boer, M., Kapsenberg, M. L. (1997). Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 90, 1920-1926.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A.Jr., Ezekowitz, R.A.B. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.

Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis, E., Sousa, C., Germain, R. N., Mellman, I., Steinman, R. M. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 191, 927-936.

Ito, T., Amakawa, R., Fukuhara, S. (2002a). Roles of toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance. *Hum Immunol* 63, 1120-1125.

Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S., Fukuhara, S. (2002b). Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195, 1507-1512.

Jacobsen, L. (2001). Preventive aspects of immunotherapy: prevention for children at risk of developing asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 87, 43-46.

Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54, 1-13.

Janeway, C. A., Jr. (2001). *Immunology*. Garland Publishing Fifth Edition.

Jankovic, D., Kullberg, M.C., Caspar, P., Sher, A. (2004). Parasite-induced Th2 polarization is associated with down-regulated dendritic cell responsiveness to Th1 stimuli and a transient delay in T lymphocyte cycling. *J Immunol* 173, 2419-2427.

Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 3388-3393.

Jiang, Z., Zamanian-Daryoush, M., Nie, H., Silva, A. M., Williams, B. R., Li, X. (2003). Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NF-kappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem* 278, 16713-16719.

Jiang, Z., Mak, T. W., Sen, G., Li, X. (2004). Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3533-3538.

Johansen, P., Senti, G., Martinez Gomez, J.M., Storni, T., von Beust, B.R., Wüthrich, B., Bot, A., Kündig, T.M. (2005). Toll-like receptor ligands as adjuvants in allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 35, 1591-1598.

Jonuleit, H., Kuhn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., Enk, A.H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27, 3135-3142.

Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczyk, M., Blaser, K., Akdis, C. A. (2003). IL-10 and TGF- $\beta$  cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 33, 1205-1214.

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., de Waal Malefyt, R., Kastelein R.A., Bazan, F., Liu, Y. J. (2001). Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J Exp Med* 194, 863-869.

Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature* 3, 984-993.

Kerschenlohr, K., Decard, S., Przybilla, B., Wollenberg, A. (2003). Atopy patch test reactions show a rapid influx of inflammatory dendritic epidermal cells in patients with extrinsic atopic dermatitis and patients with intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 111, 869-874.

Kimura, M., Tsuruta, S., Yoshida, T. (1998). Unique profile of IL-4 and IFN- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 102, 238-244.

Komastu, T., Ireland, D.D., Reiss, C.S. (1998). IL-12 and viral infections. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 277-285.

Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M.C., Bluethmann, H., Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 245-248.

Kraft, S., Novak, N., Katoh, N., Bieber, T., Rupec, R.A. (2002). Aggregation of the High-Affinity IgE Receptor Fc $\epsilon$ RI on Human Monocytes and Dendritic Cells Induces NF- $\kappa$ B Activation. *J Invest Dermatol* 118, 830-837.

Kusunoki, T., Sugai, M., Gonda, H., Nambu, Y., Nagata-Nakajima, N., Katakai, T., Kusunoki, M., Sakamoto, A., Tokuhisa, T., Nakahata, T., Yokota, Y., Shimizu, A. (2005). CpG inhibits IgE class switch recombination through suppression of NF- $\kappa$ B activity, but not through Id2 or Bcl6. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 499-506.

- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2000.). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1, 311-316.
- Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A., Steinkasserer, A. (2002). Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129(2):, 113-118.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 6, 973-983.
- Léon, B., López- Bravo, M., Ardavín, C. (2005). Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 17, 313-318.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., and Seto, Y., Yamamoto, A., Seya, T., (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171, 3154-3162.
- Maurer, D., Fiebiger, E., Ebner, C., Reininger, B., Fischer, G.F., Wichlas, S., Jouvin, M.H., Schmitt-Egenolf, M., Kraft, D., Kinet, J.P., Stingl, G. (1996). Peripheral blood dendritic cells express FcεRI as a complex composed of FcεRIα- and FcεRIγ- chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol* 157, 607-616.
- Medzhitov, R., Preston- Hurlburt, P., Janeway, C.A.Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Medzhitov, R. (2001). Toll- like Receptors and innate immunity. *Nature Reviews* 1, 135-145.
- Mitsui, H., Watanabe, T., Saeki, H., Mori, K., Fujita, H., Tada, Y., Asahina, A., Nakamura, K., and Tamaki, K. (2004). Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol* 122, 95-102.
- Moller, C., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halken, S., Host, A., Jacobsen, L., Koivikko, A., Koller, D. Y., Niggemann, B., Norberg, L. A., Urbanek, R., Valovirta, E., Wahn, U. (2002). Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J Allergy Clin Immunol* 109, 251-256.
- Moser, M., Rock, K. M., (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1, 199-205.
- Mothes, N., Heinzkill, M., Drachenberg, K. J., Sperr, W. R., Krauth, M. T., Majlesi, Y., Semper, H., Valent, P., Niederberger, V., Kraft, D., Valenta, R. (2003). Allergen-specific immunotherapy with a

monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy* 33, 1198-1208.

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P., Mantovani, A. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 11, 5998-6004.

Nakazawa, M., Sugi, N., Kawaguchi, H., Ishii, N., Nakajima, H., Minami, M. (1997). Predominance of type 2 cytokine-producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 99, 673-682.

Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Kawarabayasi, Y., Sato, S., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Tabata, S. (1994). "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1." *DNA Res* 1, 27-35.

Noon, L. (1911). Prophylactic inoculation against hayfever. *Lancet* 11, 1572.

Novak, N., Tepel, C., Koch, C., Brix, K., Bieber, T., Kraft, S. (2003a). Evidence for a differential expression of the FcepsilonRI gamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors. *J Clin Invest* 111, 1047-1056.

Novak, B., Kraft, S., Bieber, T. (2003b). Unraveling the mission of Fcepsilon RI on antigen-presenting cells. *J Allergy Clin Immunol* 111, 38-44.

Novak, N., Bieber, T. (2005). The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 53, S171-176.

Ohshima, Y., Yang, L.P., Uchiyama, T., Tanaka, Y., Baum, P., Sergerie, M., Hermann, P., Delespesse, G. (1998). OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4<sup>+</sup> T cells into high IL-4- producing effectors. *Blood* 92, 3338-3345.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C., Strauss, J.F. (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276, 10229-10233.

Oppenheim, J. J., Yang, D., Biragyn, A., Howard, O.M.Z., Plotz, P. (2002). Chemokine receptors on dendritic cells promote autoimmune reactions. *Arthritis Res* 4, 183-188.

- Osterhoff, B., Rappersberger, K., Wang, B., Koszik, F., Ochiai, K., Kinet, J.P., Stingl, G. (1994). Immunoporphical characterization of FcεRI- bearing cells within the human dermis. *J Invest Dermatol* 102, 315-320.
- Ozinsky, A., Smith, K.D., Hume, D., Underhill, D.M. (2000a). Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *JEndotoxinRes* 6, 393-396.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K., Schroeder, L., Aderem, A. (2000b). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-13771.
- Parronchi, P., Macchia, D., Piccinni, M.-P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., R., M., Ansari, A.A., Romagnani, S. (1991). Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clone established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4538-4542.
- Pietila, T. E., Veckman, V., Kyllonen, P., Lahteenmaki, K., Korhonen, T.K., Julkunen, I. (2005). Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in Salmonella-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 78, 909-920.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Porcelli, S. A., Segelke, B.W., Sugita, M., Wilson, I.A., Brenner, M.B. (1998). The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunol Today*, 362-368.
- Puggioni, F., Durham, S. R., Francis, J. N. (2005). Monophosphoryl lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th1 responses. *Allergy* 60, 678-684.
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P., Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189, 615-625.
- Raby, B. A., Klimecki, W. T., Laprise, C., Renaud, Y., Faith, J., Lemire, M., Greenwood, C., Weiland, K. M., Lange, C., Palmer, L. J., Lazarus, R., Vercelli, D., Kwiatkowski, D.J., Silverman, E.K., Martinez, F.D., Hudson, T.J., Weiss, S.T. (2002). Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 1449-1456.
- Reich, K., Heine, A., Hugo, S., Blaschke, V., Middel, P., Kaser, A., Tilg, H., Blaschke, S., Gutgesell, C., Neumann, C. (2001). Engagement of the FcεRI Stimulates the Production of IL-16 in Langerhans Cell-like Dendritic Cells. *J Immunol* 167, 6321-6329.

Renn, C. N., Sanchez, D. J., Ochoa, M. T., Legaspi, A. J., Oh, C. K., Liu, P. T., Krutzik, S. R., Sieling, P. A., Cheng, G., Modlin, R. L. (2006). TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J Immunol* 177, 298-305.

Ring, J. (2004). *Angewandte Allergologie*, 3. Auflage edn, Urban & Vogel Verlag).

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trochenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.N., Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180, 83-93.

Rossi, M., Young, J.W. (2005). Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology* 175, 1373–1381.

Saeki, H., Moore, A. M., Brown, M. J., Hwang, S. T., (1999). Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162, 2472-2475.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994). 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* 179, 1109-1118.

Sato, S., Nomura, F., Kawai, T., Takeuchi, O., Muhlradt, P. F., Takeda, K., Akira, S. (2000). Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 165, 7096-7101.

Schroder, N. W., Schumann, R. R. (2005). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 5, 156-164.

Sen, G. C., Sarkar, S. N. (2005). Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 1-14.

Seya, T., Funami, K., Taniguchi, M., Matsumoto, M. (2005). Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. *J Endotoxin Research* 11, 369-374.

Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., Rock, K.L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158, 2723-2730.

Shortman, K., Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev Immunol* 2, 151-161.

Silva, A. M., Whitmore, M., Xu, Z., Jiang, Z., Li, X., Williams, B. R. (2004). Protein kinase R (PKR) interacts with and activates mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) in response to double-stranded RNA stimulation. *J Biol Chem* 279, 37670-37676.

Steinman, R. M., Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.

Steinman, R. M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P., Mellman, I. (1999). Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* 60, 562-567.

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

Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13, 933-940.

Takeuchi, J., Watari, E., Shinya, S., Norose, Y., Matsumoto, M., Seya, T., Sugita, M., Kawana, S., Takahashi, H. (2003). Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306, 674-679.

Takeuchi, J., Watari, E., Shinya, E., Norose, Y., Matsumoto, M., Seya, T., Sugita, M., Kawana, S., Takahashi, H. (2003). Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 674-679.

Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., Simon, J.C. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 195, 99-111.

Thepen, T., Langeveld-Wildschut, E.G., Bihari, I.C., van Wichen, D.F., van Reijssen, F.C., Mudde, G.C., Bruijnzeel-Koomen, C.A. (1996). Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial Th2 response to a Th2 response in situ: an immunocytochemical study. *J Allergy Clin Immunol* 97, 828-837.

They, C., Amigorena, S. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13, 45-51.

Trinchieri, G., Pflanz, S., Kastelein, R.A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19, 641-644.

Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K.D., Aderem, A. (1999). Toll-like receptor 2 mediates mycobacteria- induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14459-14463.

Underhill, D. M., Ozinsky, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20, 825-852.

Van Reijsen, F. C., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Kalthoff, F.S., Maggi, E., Romagnani, S., Westland, J.K.T., Mudde, G.C. (1992). Skin-derived aeroallergen-specific T cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 90, 184-192.

Vollmer, J. (2005). Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9. *Expert Opin Biol Ther* 5, 673-682.

Wagner, H. (2002). Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 5, 62-69.

Weidinger, S., Klopp, N., Wagenpfeil, S., Rummeler, L., Schedel, M., Kabesch, M., Schafer, T., Darsow, U., Jakob, T., Behrendt, H., Wichmann, H.E., Ring, J., Illig, T. (2004). Association of a STAT 6 haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults. *J Med Genet* 41, 658-663.

Weidinger, S., Novak, N., Klopp, N., Baurecht, H., Wagenpfeil, S., Rummeler, L., Ring, J., Behrendt, H., and Illig, T. (2006). Lack of association between Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms and atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 118, 277-279.

Werfel, T., Morita, A., Grewe, M., Renz, H., Wahn, U., Krutmann, J., Kapp, A. (1996). Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 107, 871-876.

Werling, D., Hope, J.C., Howard, C.J., Jungi, T.W. (2004). Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 111, 41-52.

Werner, M., Topp, R., Wimmer, K., Richter, K., Bischof, W., Wjst, M., Heinrich, J. (2003). TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112, 323-330.

Werts, C., Tapping, R.I., Mathison, J.C., Chuang, T.H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D.A., Godowski, P.J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Kirschning, C.J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2, 346-352.

Wierenga, E. A., Snoek, M., deGroot, C., Chretien, I., Bos, D.J., Jansen, H.M., K., M.L. (1990). Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ T-lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 144, 4651-4656.

Wittig, H. J., Belloit, J., De Fillippi, I., Royal, G. (1980). Age- related serum immunoglobulin E levels in healthy subjects and in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 66, 305-313.

Wolff, K., Stingl, G. (1983). The Langerhans cell. *J Invest Dermatol* 80, 17-21.

Yawalkar, N., Karlsen, S., Egli, F., Brand, C.U., Graber, H.U., Pichler, W.J., Braathen, L. R. (2000). Down-regulation of IL-12 by topical corticosteroids in chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 106, 941-947.

Zarembek, K. A., Godowski, P.J. (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines. *J Immunol* 168, 554–561.

## 7 Zusammenfassung

Ausgewählte Toll-like Rezeptor (TLR)- Agonisten werden als Adjuvanzien in SIT-Protokollen für Patienten mit atopischer Disposition verwendet. Wir haben aus Monozyten gewonnene dendritische Zellen (mDCs) von 8 hoch-atopischen Patienten (Serum-IgE > 1000 iU/ml) und von gesunden Kontrollpersonen (Serum-IgE <75 iU/ml) bezüglich ihrer TLR-Expression verglichen.

Beide Gruppen zeigten eine sehr ähnliche TLR-Expression. TLR2,4,5 und 6 wurden am stärksten, TLR1,3 und 8 moderat exprimiert. TLR7,9 und 10 waren kaum oder nicht nachweisbar. Auch die Expression der Oberflächenmarker CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86, CCR3, CXCR4, Mannose- Rezeptor, Fc epsilon R I, MHC-I und HLA-DR war vergleichbar bei atopischen und nicht-atopischen mDCs.

Stimulation mit den TLR-Liganden PGN (TLR2), Poly IC (TLR3), LPS (TLR4) und Flagellin (TLR5) induzierte eine Reifung der mDCs beider Gruppen. CpG-DNA (TLR9) führte, entsprechend der mangelnden Expression von TLR9, zu keiner Reifung.

Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 wurden bei mDCs atopischer Probanden stärker hochreguliert. MDCs der Kontrollgruppe hingegen induzierten vermehrt die antigenpräsentierenden Moleküle MHC-I und HLA-DR. Die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- $\alpha$  wurden in beiden Gruppen in vergleichbaren Mengen produziert.

Aktivierung von TLR3 durch Poly IC führte zur stärksten Zytokinproduktion und Hochregulierung von Reifemarkern in beiden Gruppen. Die nachfolgend stärksten Effekte zeigten LPS, PGN und Flagellin. Interessanterweise wird TLR3 sowohl bei atopischen als auch bei gesunden Probanden nur moderat exprimiert. Jedoch wurden in beiden Gruppen die zusätzlichen Poly IC/ dsRNA- Rezeptoren PKR und RIG-I funktionell nachgewiesen.

Die systematische genetische Analyse von Polymorphismen der Gene TLR2, 3 und 4 zeigte keine größeren Allel- oder Genotypunterschiede zwischen den Probandengruppen. Die gleichen Ergebnisse wurden in einer größeren Kohorte mit 275 Eltern-Kind-Trios mit atopischem Ekzem erzielt. Es konnten keine Assoziationen von TLR2, 3 und 4- Polymorphismen und Atopie beobachtet werden.

Aus unseren Studien geht hervor, dass TLR-Liganden geeignete Induktoren einer Th1-Antwort und der DC-Reifung bei hochatopischen Probanden sind. Sie stellen geeignete Adjuvanzien für SIT-Lösungen dar, um die Th2-dominierte Immunantwort dieser Patienten zu verändern. Neben bereits etablierten Adjuvanzien sollten auch p Poly IC, PGN und Flagellin als mögliche Verstärker einer Th1-Induktion im Rahmen von SIT-Protokollen in Betracht gezogen werden.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AB	Asthma bronchiale
Abb.	Abbildung
AE	Atopisches Ekzem
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierenden Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CpG	unmethylierte Nukleotidstränge mit Cytosin-Guanin-Motiven
cpm	“counts per minute” (Zahl der Zerfälle pro Minute)
Derm. pter.	Dermatophagoides pteronyssius
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	“desoxyribonucleic acid” (Desoxyribonukleinsäure)
DNP	Dinitrophenyl
ds	“double stranded” (doppelsträngig)
DTT	1,4-Dithiothreitol
DC	Dendritische Zelle
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
ELC	„EBI1-ligand chemokine“
ELISA	“enzyme-linked-immunoabsorbent-assay”
FACS	“fluorescence-activated cell sorting”
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum

FSC	“forward scatter”, Auftreffrichtung
GM-CSF	“granulocyte-macrophage colony stimulating factor”, (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HRP	„horse-raddish-peroxidase“, (Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase)
HSA-DNP	Humanes Serum Albumin - Dinitrophenyl
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
KLH	“keyhole limpet hemocyanin” von <i>Megathura crenulata</i>
LC	Langerhans- Zelle
Lj.	Lebensjahr
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
mDC	monocyte-derived dendritic cell
ME	Mercaptoethanol
MFI	“mean fluorescence intensity”
MHC	“major histocompatibility complex”, (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MPLA	Monophosphoryl- Lipid A
MyD88	“myeloid differentiation factor 88”
MZ	Mastzelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NTP	Nukleotid-Triphosphat
OD	optische Dichte

ODN	“oligodinucleotide” (Oligodinukleotid)
OspA	“outer surface protein A”, (Oberflächenprotein A, Borrelia burgdorferi)
OVA	Ovalbumin
PAMPs	“pathogen-associated molecular patterns”
PBS	“phosphate buffer saline” (Phosphatpuffer)
PCR	“polymerase chain reaction” (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PG	Prostaglandin
PGN	Peptidoglykan
PMA	Phorbolmyristataacetat
PO	Phosphodiester
Poly IC	synthetisches Analog von dsRNA
PRR	“pathogen recognition receptor”
PTO	Phosphothioat
RCA	Rhinoconjunktivitis allergica
RNA	“ribonucleinacid” (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribunuklease
rpm	“rounds per minute” (Umdrehungen pro minute)
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SNP	single nucleotide polymorphism
ss	“single stranded” (einzelstängig)
SSC	“side scatter”, 90°- Richtung
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
Th1	T-Helfer 1
Th2	T-Helfer 2
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

Tween20	Poly(oxyethylen) <sub>n</sub> -Sorbitant-Monolaurat
U	Unit (Enzymeinheit)
ü.n.	über Nacht
V	Volt
v/v	“volume per volume”, Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	“weight per volume”, Gewicht pro Volumen

## 9 Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Doktorbetreuer, Herrn PD Dr. Martin Mempel, für die exzellente und intensive Betreuung meiner Arbeit, die geduldige Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten sowie für die Möglichkeit, von seinem hervorragenden Wissen zu profitieren. Er hat mich sehr gefördert und unterstützt.

Herrn Prof. Dr. Ollert danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und sein stetiges Interesse an meiner Arbeit, sowie für zahlreiche weiterführende Diskussionen.

Herrn Behnam Naderi-Kelali danke ich für intensive Zusammenarbeit, unermüdliche Hilfe und Diskussionsbereitschaft.

Bei Gaby Roth, Kerstin Holtz und Beate Heuser bedanke ich mich für freundschaftliche und tatkräftige Unterstützung.

Ebenfalls herzlichen Dank an Dr. Stephan Weidinger für die genetischen Assoziationsanalysen und die konstruktive Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ring bin ich dankbar für die Möglichkeit, einen Teil meiner wissenschaftlichen und klinischen Ausbildung an seiner Klinik absolviert haben zu dürfen. Meine Entwicklung wurde von ihm stets mit Interesse und Wohlwollen unterstützt.

Mein größter Dank gilt Kaaweh Molawi für alle liebevolle Unterstützung und meinen Eltern für die Selbstverständlichkeit, mit der sie mir so Vieles ermöglichen und für mich da sind.

## 10 Lebenslauf

Name: Mette- Sophie Dorothea Terhorst  
geboren: am 11.08.1981 in Bonn  
Eltern: Dr. med. Gudrun Terhorst- Ferber, Prof. Dr. jur. Bruno Terhorst  
Geschwister: Georg Terhorst, LL.M.; Johanna Strohm, MA

### Schulbildung

1991-2000 Städtisches Anno-Gymnasium, Siegburg  
08/1997-01/1998 Rendcomb College, Gloucestershire, England  
02-07/1998 Lycée Blaise Pascal, Lyon, Frankreich  
06/2000 Abitur

### Studium der Humanmedizin

#### Vorklinische Ausbildung

2000-2002 Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn  
09/2002 Ärztliche Vorprüfung

#### Klinische Ausbildung

2002 Technische Universität München  
09/2003 1. Staatsexamen  
09/2005 2. Staatsexamen  
04/2007 3. Staatsexamen, Approbation

#### Praktisches Jahr

04-06/2006 Innere Medizin, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA  
06-08/2006 Innere Medizin, Inselspital Bern, Schweiz  
08-12/2006 Chirurgie, Hôtel-Dieu, Université René Descartes Paris 5,  
Frankreich  
12/2006-03/2007 Wahlfach Dermatologie, Klinik für Dermatologie und Allergologie  
der Technischen Universität München am Biederstein

Seit 06/2007 Tätigkeit als Assistenzärztin am Haut Tumor Centrum Charité (Leiter: Prof. Dr. E. Stockfleth) der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Universitätsmedizin Berlin (Leiter: Prof. Dr. W. Sterry).

## 11 Veröffentlichungen

Aus dieser Arbeit wurde publiziert:

### Original Publikationen

D. Terhorst, B. Naderi Kalali, St. Weidinger, Th. Illig, N. Novak, J. Ring, M. Ollert, M. Mempel

*Monocyte-derived dendritic cells from highly atopic individuals are not impaired in their pro-inflammatory response to toll-like receptor ligands.*

Clin Exp Allergy. 2007 Mar; 37 (3) 381-90. PMID: 17359388

### Poster

D. Terhorst, B. Kalali, L. Rümmler, St. Weidinger, Th. Illig, J. Ring, M. Ollert, M. Mempel

*Monocyte-derived dendritic cells from highly atopic patients show no impaired response to toll-like receptor agonists*

Poster im Rahmen des 25. Kongresses der European Academy of Allergology and Clinical Immunology, EAACI vom 10. bis 14. Juni 2006 in Wien, Abstract 309

D. Terhorst, B. Kalali, L. Rümmler, St. Weidinger, Th. Illig, J. Ring, M. Ollert, M. Mempel

*Monocyte-derived dendritic cells from highly atopic patients show no impaired response to toll-like receptor agonists*

Poster im Rahmen des 36. Kongresses der European Society for Dermatological Research, ESDR, vom 07. bis 09. September 2006 in Paris, Abstract 397