

5 Diskussion

Die Mitglieder der *Toll-like* Rezeptoren gehören zur Gruppe der mustererkennenden Rezeptoren und werden unter anderem auf Zellen des Immunsystems exprimiert. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Erkennung mikrobieller Pathogen-assoziiertes molekularer Muster. Aufgrund ihres immunmodulierenden Potentials über die Produktion von Zytokinen wie IL-12 vorwiegend eine Immunantwort vom Th1-Typ zu induzieren nehmen sie möglicherweise eine Schlüsselstellung in der Pathogenese von Erkrankungen ein, die durch eine Th1/Th2-Dysbalance gekennzeichnet sind [46]. Bei der atopischen Dermatitis führt eine bisher noch ungeklärte genetische Disposition initial zu einer durch Th2-Zytokine dominierten Immunantwort. Im Verlauf ebenfalls involvierte Th1-Zellen tragen zur Chronifizierung der Erkrankung bei [68]. Die pathogenetischen Mechanismen, die zur Entwicklung einer atopischen Dermatitis führen, sind multifaktoriell und zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig aufgeklärt. Sowohl Komponenten des spezifischen als auch des unspezifischen Immunsystems scheinen involviert zu sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob oder inwieweit, sich die TLR-Expressionprofile zwischen erwachsenen Patienten mit atopischer Dermatitis quantitativ und gegebenenfalls auf funktioneller Ebene von hautgesunden Probanden unterscheiden. Hierzu wurde die Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2, 4 und 9 in mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) bei erwachsenen Patienten mit atopischer Dermatitis und hautgesunden Probanden untersucht. Es wurden Expressionsdaten auf mRNA-Ebene in Gesamt-PBMC, Monozyten und B-Lymphozyten und bei einigen Proben in T-Lymphozyten erhoben. Hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit ein *real-time* PCR-System nach dem *TaqMan*TM-Prinzip etabliert werden. Die Oberflächenexpression auf Monozyten des peripheren Bluts wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Des Weiteren wurden Monozyten mit TLR2-spezifischen Liganden stimuliert, um funktionelle Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu erfassen.

Im Folgenden sollen zunächst die Methodik und anschließend die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Kontext aktueller Literatur diskutiert werden.

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 *Real-time* PCR und Reverse Transkription

Die *real-time* PCR ist eine der zur Zeit modernsten Methoden zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Derzeit existieren verschiedene Prinzipien, wie zum Beispiel *molecular beacon*, *hybridization probes*, die Verwendung von *SYBR Green I* oder das in der vorliegenden Arbeit angewendete *TaqMan*TM Prinzip [82]. Der Vorteil dieses verwendeten Prinzips ist seine hohe Spezifität

(vgl. Material und Methoden Abschnitt 3.2.9). Nur wenn das Probenmaterial die Zielsequenz aufweist, kann die Sonde sequenzspezifisch hybridisieren und ein entsprechendes Fluoreszenzsignal freigesetzt werden. Das bedeutet, dass entstehende Primerdimere oder andere unspezifische Produkte nicht zu einem Anstieg des Messsignals führen. Die Spezifität von SYBR Green I, einem Farbstoff, der nicht sequenzspezifisch in doppelsträngige DNA eingebaut wird, ist im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten sequenzspezifischen Sonden deutlich geringer [83].

Da entstehende unspezifische Produkte, wie zum Beispiel Primerdimere, den Verlauf der PCR behindern und dadurch deren Effizienz negativ beeinflussen, ist es jedoch auch bei Anwendung des *TaqMan*TM Prinzips sinnvoll, die verwendeten Primer-Sonden-Systeme auf ihre Spezifität zu überprüfen. Die in Abbildung 7 dargestellten PCR-Ergebnisse zeigen, dass bei den hier verwendeten Primern und Sonden nur je ein PCR-Produkt entstand. Die Größe des jeweiligen Produkts wurde auf einem 2%igen Agarosegel überprüft und stimmte mit der erwarteten Größe überein.

Andere Methoden zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, wie zum Beispiel der *Northern Blot* oder der *RNase Protection Assay*, haben den Nachteil, dass hierfür eine hohe Menge an Ausgangsmaterial benötigt wird und sie eine vergleichsweise niedrigere Sensitivität aufweisen [82, 84]. Der Vorteil des hier eingesetzten *TaqMan*TM Prinzips ist neben seiner hohen Spezifität die hohe Sensitivität auch bei sehr niedrigen Kopienzahlen [85]. Obwohl der für die Analyse der Expression bedeutungsvolle Anteil der mRNA nur 2% an der Gesamt-RNA ausmacht, ist somit die Extraktion von Gesamt-RNA durch die Amplifikation in der nachgeschalteten PCR ausreichend. Ein Nachteil des *TaqMan*TM Prinzips sind die verhältnismäßig hohen Kosten der eingesetzten fluoreszenzgekoppelten Sonden.

5.1.2 Reverse Transkription

Die Reproduzierbarkeit des PCR-Ergebnisses hängt vor allem von der Reversen Transkription ab. Da die Effizienz der Reversen Transkription abhängig von den gewählten Primern und dem verwendeten Enzym variiert, ist es sinnvoll, in Vorversuchen die geeignete Enzym-Primer-Kombination für das untersuchte Zielgen zu evaluieren [86]. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Reverse Transkriptasen in Kombination mit verschiedenen Primertypen untersucht. Die Kombination mit der höchsten Effizienz wurde für die weiteren Versuche ausgewählt (siehe Abbildung 9).

5.1.3 Referenzgene (*housekeeping genes*)

Bei der relativen Quantifizierung werden Referenzgene als interne Standards mitgeführt, um methodische Störfaktoren wie z.B. Gewebe- und Matrixeffekte zu reduzieren. Die Transkriptmenge der Zielgene wird hierbei auf die Transkriptmenge des Referenzgens normiert. Vandesompele et al. empfehlen zur Genexpressionsanalyse die Verwendung von mindestens zwei Referenzgenen. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) werden neben weiteren als die in

PBMC am konstantesten exprimierten Haushaltsgene beschrieben [78]. Sie wurden deshalb für diese Arbeit ausgewählt und erfüllten beim Vergleich der Expressionsraten zwischen AD-Patienten und der Kontrollgruppe die Kriterien eines Referenzgens. Eine andere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass Monozyten von AD-Patienten stärker β 2-Mikroglobulin exprimieren als Zellen einer gesunden Kontrollgruppe. Dies stimmt nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Bei den Daten der zitierten Arbeitsgruppe ist kritisch anzumerken, dass die untersuchten Gruppen unterschiedlich groß waren und kein korrektes „*Matching*“ bezüglich Alter und Geschlecht durchgeführt wurde [87]. Das Alter jedoch ein Einflussfaktor auf die TLR-Expression darstellt, könnte dies eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. In Abschnitt 5.2.4 wird darauf noch ausführlicher eingegangen.

5.1.4 Adhärenz

Adhärenz von Zellen, z.B. an verwendeten Plastikmaterialien, hat einen Einfluss auf die Expression von *Toll-like* Rezeptoren. So regulieren beispielsweise Monozyten die Oberflächenexpression von TLR4 nach Adhäsion herab [88]. Um eine durch Adhärenz der Zellen bedingte Veränderung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden die entnommenen Blutproben nach der Entnahme direkt weiterverarbeitet. Die Schritte zur Isolierung der Monozyten aus Vollblut und die Färbung der Oberflächenantigene wurden aus diesem Grund bei 4°C durchgeführt außerdem wurde ein Phosphatpuffer ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} verwendet, wodurch die Adhärenz der Zellen verhindert bzw. deutlich reduziert wird. Die Stimulationen mit Lipopeptiden und LTA wurden deshalb, um einen systematischen Fehler durch Adhärenz der Zellen auszuschließen, in 96-well-Platten für Suspensionskulturen durchgeführt.

5.2 Einflussgrößen

5.2.1 Akute Infektionen, schwere systemische Erkrankungen

Da *Toll-like* Rezeptoren in Abwehrprozesse gegen mikrobielle Pathogene involviert sind und ihre Expression im Rahmen akuter oder schwerer systemischer Erkrankungen variieren kann, wurden nur Personen in die Patienten- bzw. Kontrollgruppe eingeschlossen, bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine akuten Infektionen oder schwere systemische Erkrankungen vorlagen [16].

5.2.2 Medikamente

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme führten 5 der 16 Patienten mit atopischer Dermatitis eine lokale Therapie mit Protopic®, einer Tacrolimus-haltigen Salbe zur topischen Applikation, durch. Tacrolimus inhibiert Calcineurin, wodurch nachfolgend eine Dephosphorylierung von zytoplasmatischen NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen)-Proteinen unterbleibt. Dies führt zur Hemmung der IL-2 Produktion und einer Minderung der T-Zell-Aktivität [89]. Bei lokaler Anwendung konnte sowohl bei

Kindern als auch bei Erwachsenen keine systemische Immunsuppression auf das zirkulierende Immunsystem festgestellt werden, so dass ein Einfluss auf die TLR-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Bluts unwahrscheinlich ist [90, 91]. 3 Patienten verwendeten zum Zeitpunkt der Blutentnahme topische Glukokortikoidpräparate. Kein Patient nahm systemisch wirksame Glukokortikoide ein. Eine aktuelle Studie, die den Einfluss von Tacrolimus und dem Glucocorticoid Budesonid auf die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und TLRs in Keratinozyten untersucht hat, konnte unter dem Einfluss von Budesonid eine Veränderung der TLR2-Expression feststellen. In der Studie wurden jedoch nicht Zellen des peripheren Bluts sondern Keratinozyten in Zellkultur untersucht, die direkt mit den Medikamenten stimuliert wurden [92]. Ob die topische Applikation von Cortisonpräparaten auf die TLR-Expression von Zellen des peripheren Bluts haben, ist derzeit nicht bekannt. Der Vergleich der Expressionsraten der untersuchten *Toll-like* Rezeptoren 2, 4 und 9 bei den Patienten, die mit Protopic® oder topischen Glukokortikoidpräparate behandelt wurden, zeigen keine Unterschiede zu den Ergebnissen der unbehandelten AD-Patienten.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Monozyten und B-Lymphozyten weisen auf mRNA- und Proteinebene unterschiedliche TLR-Expressionsprofile auf

Der Vergleich der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 1 bis 10 in verschiedenen Subpopulationen von PBMC zeigt, dass Monozyten in hohem Maß TLR4, am stärksten aber TLR2 exprimieren. Dagegen gehören B-Lymphozyten neben plasmazytoiden dendritischen Zellen zu den Zellen des peripheren Bluts, die die höchsten Level an TLR9 exprimieren [23]. In Übereinstimmung mit diesen Daten ergaben die in dieser Arbeit gemessenen Expressionsprofile, dass Monozyten, unabhängig von der untersuchten Probandengruppe, auf mRNA-Ebene deutlich mehr TLR2 als TLR4 und -9 exprimieren. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass periphere B-Lymphozyten eine deutlich höhere TLR9-Expression als Monozyten aufweisen. Die Unterschiede zwischen den untersuchten Zellpopulationen ließen sich sowohl bei den AD-Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen nachweisen. Die mittels *real-time* PCR erhobenen Daten zur Expression auf mRNA-Niveau konnten mittels durchflusszytometrischer Messungen auf die Proteinebene erweitert werden. Die Ergebnisse der Analyse der Oberflächenexpression der *Toll-like* Rezeptoren 2 und 4 stimmen mit den Daten auf mRNA-Niveau überein. Auf Proteinebene konnte auf Monozyten ebenfalls eine stärkere TLR2- als TLR4-Expression festgestellt werden.

5.3.2 Erwachsene Patienten mit atopischer Dermatitis weisen eine gesteigerte TLR2-Expression in PBMC auf

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Patienten, die an einer atopischen Dermatitis leiden, im Vergleich zu gesunden Personen ein verändertes Expressionsprofil der *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9 aufweisen. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass in PBMC erwachsener AD-Patienten die TLR2-Expression statistisch signifikant gesteigert ist.

5.3.2.1 Die Hautbesiedlung mit *Staphylococcus aureus* als eine mögliche Ursache einer gesteigerten TLR2-Expression

Eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit festgestellte gesteigerte TLR2-Expression in der Gruppe der AD-Patienten ist möglicherweise die Besiedelung der Haut mit *Staphylococcus aureus*. Dieses gram-positive Bakterium kann bei 80 – 100% der Patienten mit atopischer Dermatitis in Hautläsionen nachgewiesen werden [93]. Die wichtigsten immunstimulatorischen Komponenten von gram-positiven Bakterien sind Lipoteichonsäuren (LTA), Peptidoglykane, Lipoproteine und Lipopeptide. Diese gehören wie auch LPS und nicht methylierte CpG-Motive zu den sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs).

Verschiedene Studien konnten TLR2 als den verantwortlichen Rezeptor zur Erkennung von LTA identifizieren [39, 94]. Die fast regelhafte Kolonisierung mit *Staphylococcus aureus* führt bei mehr als der Hälfte der AD-Patienten zur Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern gegen Staphylokokken-Superantigene, wie das Staphylokokkenenterotoxin B, und einer durch die T-Zell-Aktivierung bedingten Produktion verschiedener Zytokine (u.a. TNF- α , IL-2 und IFN- γ) [95]. Diese pro-inflammatorischen Zytokine induzieren ihrerseits die Expression von TLR2 [49, 53]. Dass eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* mit einer gesteigerten Expression von TLR2 einhergehen kann, zeigen unter anderem auch Daten von Patienten, die unter einer durch *Staphylococcus aureus* verursachten Sepsis leiden. Sowohl auf mRNA- als auf Proteinebene ließen sich in dieser Patientengruppe höhere TLR2-Level als bei der gesunden Kontrollgruppe nachweisen [96]. Die Immunprozesse während einer akuten systemischen Entzündungsreaktion wie einer Sepsis sind komplex. So kann die gesteigerte TLR2-Expression möglicherweise auch Ausdruck eines generell höheren Aktivierungsgrads sein. Die monozytäre HLA-DR-Expression und die *ex vivo* TNF- α -Produktion nach Stimulation mit LPS (also einer Stimulation mit PAMPs über ein Mitglied der Toll-like Rezeptorfamilie) scheinen gute Parameter zur Erfassung der Immunkompetenz des Organismus im Verlauf einer Sepsis oder eines SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) darzustellen [97]. Bei AD-Patienten, die eine Besiedelung mit Superantigenproduzierenden Staphylokokken aufweisen, lässt sich eine hohe Expression des T-Zell Aktivierungsmarkers HLA-DR beobachten, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert [98]. In zukünftigen Untersuchungen könnte es sinnvoll sein, mit Hilfe einer Cofärbung einer möglichen Korrelation zwischen der Expression von HLA-DR und TLR2 nachzugehen.

5.3.3 Kinder, die in ländlicher Umgebung aufwachsen, weisen veränderte TLR2-Expressionsraten auf

Über die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren werden antigenpräsentierende Zellen dazu angeregt Zytokine wie IL-12 zu produzieren und infolgedessen wird eine Immunantwort vom Th1-Typ induziert [46]. Deshalb ließe sich vermuten, dass Patienten mit einer Th2-dominierten Erkrankung wie der atopischen Dermatitis eine geringere TLR-Expression als eine gesunde Kontrollgruppe aufweisen. Für die Expressionsrate des TLR2 in PBMC trifft dies jedoch nicht zu. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen vielmehr eine verstärkte Expression von TLR2 in der Gruppe der AD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine europäische Studiengruppe, die sich ebenfalls mit der Untersuchung von TLR-Expressionsprofilen im Zusammenhang mit atopischen Erkrankungen beschäftigt hat, konnte bei Kindern, die auf Bauernhöfen aufwachsen, eine deutlich gesteigerte TLR2-Expression in PBMC gegenüber einer Kontrollgruppe feststellen [69]. Davon ausgehend, dass die gesteigerte TLR2-Expression bei Bauernkindern die Immunantwort über die TLR-Signalkaskade vornehmlich in eine Th1-Richtung lenkt, könnte dies einen protektiven Faktor gegenüber der Entwicklung von Th2-dominierten

Erkrankungen wie allergischem Asthma oder Heuschnupfen darstellen (Abbildung 28). In einer weiterführenden Untersuchung konnte diese Studiengruppe zeigen, dass die Exposition mit hohen Endotoxinspiegeln (einem Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien), wie sie zum Beispiel auf Bauernhöfen zu finden sind, tatsächlich invers mit dem Auftreten von allergischem Asthma und Heuschnupfen assoziiert ist: Kinder, die höheren Endotoxinspiegeln ausgesetzt waren, wiesen im Gegensatz zur Vergleichsgruppe signifikant seltener Erkrankungen wie allergisches Asthma oder Heuschnupfen auf [61]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen durch verbesserte hygienische Bedingungen und eine damit verbundene Abnahme der mikrobiellen Stimulation im Kindesalter bedingt sind [99].

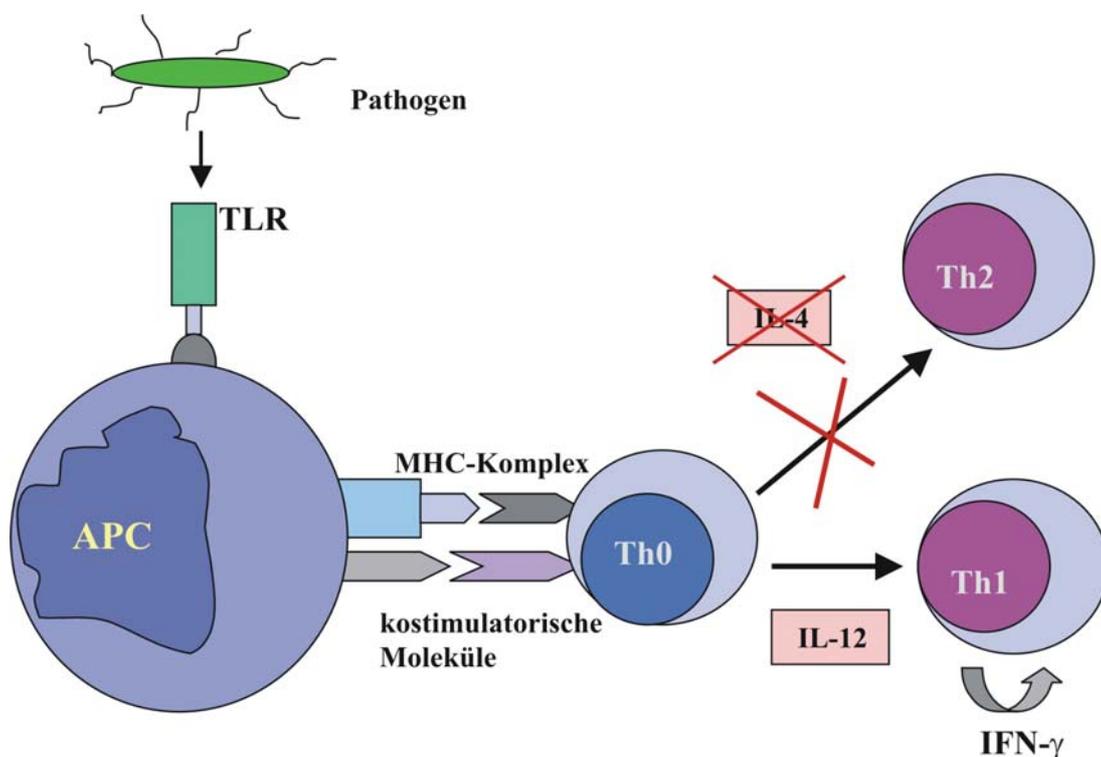


Abbildung 28: Modell der Regulation der Th-Zell-Antwort durch *Toll-like* Rezeptoren

Die Stimulation des angeborenen Immunsystems führt über die Aktivierung der TLR-Signaltransduktionskaskade zur Induktion einer Th1-Antwort. Eine Immunantwort vom Th2-Typ wird gleichzeitig unterdrückt.

5.3.4 Alter - eine wichtige Einflussgröße auf die TLR-Expression

Die Daten der zitierten Studiengruppe zeigen eine höhere TLR2-Expression bei Kindern, die einer höheren mikrobiellen Belastung ausgesetzt waren und, möglicherweise dadurch bedingt, seltener atopische Erkrankungen aufweisen. Die Daten der hier vorliegenden Arbeiten zeigen dagegen eine höhere

TLR2-Expression in der Gruppe der Patienten mit atopischer Erkrankung, in diesem Fall einer atopischer Dermatitis. Im folgenden Abschnitt soll einigen möglichen Ursachen für die Gegensätzlichkeit der Ergebnisse nachgegangen werden.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der vorliegenden Arbeit und den zitierten Studien von Lauener und Braun-Fahrländer et al. besteht im unterschiedlichen Alter der untersuchten Populationen. Beide genannten Studien wurden bei Kindern durchgeführt (Durchschnittsalter 10,3 bzw. 9,5 Jahre), während in der vorliegenden Arbeit erwachsene Patienten untersucht wurden. In Untersuchungen zu altersabhängigen Veränderungen des Immunsystems konnte festgestellt werden, dass im Alter unter anderem die Zahl einzelner Zellfraktionen (z.B. B- und T-Lymphozyten) sinkt und Th1-Zytokine wie IFN- γ abnehmend, dagegen Th2-Zytokine wie IL-4 vermehrt produziert werden. Die Balance zwischen Th1- und Th2-Zellen scheint darüber hinaus im Alter zunehmend in Richtung einer Th2-Antwort verschoben zu sein [100, 101]. Auch die Expression der *Toll-like* Rezeptoren scheint sich altersabhängig zu verändern. Die Expression der TLR1 - 9 nimmt in murinen Makrophagen mit zunehmendem Alter der Tiere ab [102]. Diese Ergebnisse ließen sich in einer Studie, in der die Effekte einer LPS-Stimulation auf die TLR4-Expression untersucht wurden, in menschlichen Nasenschleimhautzellen nachvollziehen. Diese Daten zeigten, dass Kinder mit einer atopischen Erkrankung eine fünf- bis zehnfach stärkere Expression des TLR4 aufweisen als erwachsene Atopiker. Neben einer quantitativen Verschiebung der TLR-Expression lassen sich altersabhängig auch funktionelle Unterschiede feststellen. Die Stimulation mit LPS bewirkte in der Nasenschleimhaut von atopischen Kindern einen signifikanten Anstieg der TLR4-Expression, während sich bei Erwachsenen kein Effekt zeigte [29]. In diese Richtung deuten auch die Daten einer Arbeitsgruppe, die kürzlich zeigen konnte, dass mit zunehmendem Alter die TLR4-vermittelte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) nach LPS-Stimulation abnimmt [103]. Demzufolge gibt es bei der Expression der *Toll-like* Rezeptoren altersabhängig eine quantitative Varianz und abhängig vom Atopiestatus, zumindest TLR4 betreffend, auch eine funktionelle Varianz. Dies wäre für TLR2 ebenfalls denkbar und sollte in weiteren experimentellen und klinischen Untersuchungen weitergeführt werden. Um eine mögliche Korrelation zwischen dem Alter und der TLR-Expression zu untersuchen, wurden bereits die Daten der vorliegenden Arbeit diesbezüglich überprüft. Eine Korrelation konnte zwischen diesen Parametern jedoch nicht festgestellt werden. Da alle Probanden, deren Proben in diese Untersuchung eingegangen sind, Erwachsene sind, ist eine fehlende Korrelation möglicherweise damit erklärbar.

Es ist sinnvoll in weiterführenden Untersuchungen die Expressionsanalysen auf Proben von Kindern, die unter einer atopischen Dermatitis leiden, auszuweiten.

5.3.5 Toll-like Rezeptoren tragen möglicherweise zur Chronifizierung von Entzündungsreaktionen bei

Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich zum einen durch eine veränderte TLR-Expression und/oder deren Stimulierbarkeit erklären, zum anderen kann die Chronifizierung der Entzündung eine wichtige pathogenetische Rolle spielen. Der Verlauf der atopischen Dermatitis scheint, wie verschiedene Studien zeigen konnten, nicht nur durch eine rein TH2-vermittelte Inflammation charakterisiert zu sein. Vielmehr handelt es sich um eine komplexe Immunantwort, in die sowohl Th2-typische Zytokine wie IL-4 und IL-5 als auch Th1-Zytokine wie IFN- γ involviert sind.

In akuten Hautläsionen von AD-Patienten lässt sich eine gesteigerte Anzahl an TH2-Zellen und eine verstärkte Expression von IL-4, -5 und -13 nachweisen. In chronischen Läsionen kommt es dahingegen nach einer initialen Th2-dominierten Phase zu einer Phase, die durch das Auftreten IFN- γ produzierender Th1-Zellen gekennzeichnet ist. Dieser Wandel ist vermutlich auf den Einfluss von einwandernden eosinophilen Granulozyten und eine Ansammlung aktivierter Monozyten und dendritischer Zellen zurückzuführen, die IL-12-sezernieren (siehe Abbildung 29) [55, 68].

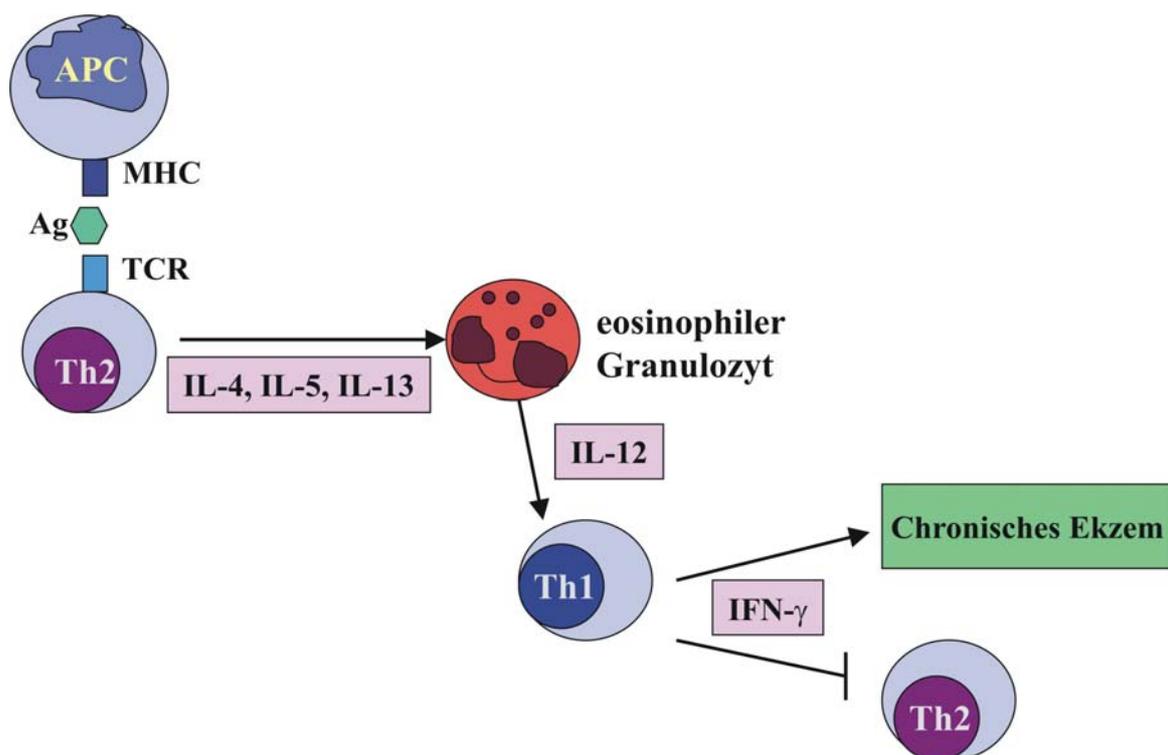


Abbildung 29: Modell der Pathogenese der atopischen Dermatitis

Eine bis heute nicht völlig aufgeklärte initiale Prädisposition führt bei der atopischen Dermatitis in akuten Hautläsionen zu einer Th2-vermittelten Immunantwort. Im Verlauf der Entzündung kommt es in chronischen Hautläsionen zu einem Anstieg der Th1-Zytokine wie IFN- γ .

Für das charakteristischerweise von Th1-Lymphozyten sezernierte Zytokin Interferon- γ konnte gezeigt werden, dass Monozyten des peripheren Bluts unter Einfluss dieses Zytokins die Expression von TLR2 (und -4) heraufregulieren [53]. Da über die Aktivierung der TLR-Signalkaskade die nachfolgende Immunreaktion moduliert werden kann, wurde bereits in mehreren Studien untersucht, inwiefern sich TLRs als potentielle Angriffspunkte für präventive oder therapeutische Maßnahmen eignen.

Klinische Studien zeigen, dass sich die Stimulation mit Laktobazillen in der frühen Kindheit protektiv gegenüber der Entwicklung einer atopischen Dermatitis auswirkt [104]. Bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen, bei denen sich bereits eine Allergie gegenüber Birkenpollen etabliert hat, wird durch die Gabe von Laktobazillen das Krankheitsbild dagegen nicht verbessert [105]. Darüber hinaus konnte bei Patienten mit bereits etabliertem, allergischem Asthma gezeigt werden, dass der Schweregrad der Erkrankung mit der in der Wohnung gemessenen Endotoxinkonzentration korreliert: je höher die Endotoxinbelastung, desto ausgeprägter die Beeinträchtigung der Patienten [106]. Eine gesteigerte Exposition mit PAMPS, wie in den zitierten Beispielen für Laktobazillen und Endotoxin gezeigt, kann somit im Stadium der Etablierung die Entzündungsreaktion durch Aktivierung der TLR-Signalkaskade und eine kontinuierliche Stimulation der Th1-Immunreaktion aufrecht erhalten.

Neben altersspezifischen Modulationen scheinen somit auch der Zeitpunkt des Kontakts mit immunstimulierenden, mikrobiellen Produkten sowie deren Konzentration eine wichtige Rolle auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung atopischer Erkrankungen zu spielen. Sowohl die AD-spezifischen Immunprozesse im Verlauf einer Chronifizierung als auch die kontinuierliche Stimulation der TLR-Signalkaskade, wie zum Beispiel durch eine bakterielle Besiedlung der Haut, könnten somit Ursachen der festgestellten höheren TLR2-Expression in der Gruppe der AD-Patienten sein.

5.3.6 Patienten mit atopischer Dermatitis weisen in Monozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine gesteigerte TLR2-Expression auf

Monozyten sind in der Literatur als die Zellpopulation beschrieben, die, verglichen mit anderen mononukleären Zellen des peripheren Bluts, am stärksten TLR2 exprimieren [23]. Da sich in PBMC ein Unterschied zwischen beiden untersuchten Gruppen feststellen ließ, wurden weiterführende Expressionsanalysen in Monozyten angeschlossen.

Bei der Untersuchung der Expressionsraten von TLR2 konnte in Monozyten ebenfalls gezeigt werden, dass die Gruppe der AD-Patienten TLR2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene stärker exprimieren als die Kontrollgruppe. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine gesteigerte Expression von TLR2 auf mRNA-Ebene in Monozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis gegenüber einer gesunden Vergleichsgruppe zeigen [87].

Um die klinische Relevanz der verstärkten TLR-Expression zu prüfen, wurden Monozyten mit TLR2-Liganden (triacylierte Lipopeptide und Lipoteichonsäure) stimuliert. Für die Stimulationen der Monozyten wurden kommerzielle, synthetische triacylierte Lipopeptide und Lipoteichonsäure-Extrakte (freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. R. Schumann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin, zur Verfügung gestellt) eingesetzt. Lipoteichonsäuren kommen in der Zellwand gram-positiver Bakterien vor und induzieren über TLR2 in humanen Monozyten unter anderem die Produktion von Zytokinen wie TNF- α . Dieser Weg ist unabhängig von TLR4 [39]. Über die Stimulation mit triacylierten Lipopeptiden, wie sie zum Beispiel in Mykoplasmen und in Bakterien der Familie der *Enterobacteriaceae* vorkommen, wird in Monozyten ebenfalls die Sekretion von TNF- α induziert [41].

Nach vierstündiger Inkubation mit den TLR2-Liganden wurde die TNF- α -Konzentration in den Zellüberständen mittels ELISA gemessen. Da LPS über TLR4 ebenfalls die Produktion von TNF- α in Monozyten induziert, ist es wichtig, LPS-freie Extrakte zur Stimulation einzusetzen. Die zur Stimulation eingesetzten LTA-Extrakte wurden so aufgereinigt, dass gewährleistet ist, dass die Extrakte frei von LPS-Kontaminationen sind und eine hohe biologische Aktivität aufweisen [107]. Die tri-acylierten Lipopeptide waren ebenfalls LPS-frei.

Nach Stimulation mit 25 ng/ml Pam₃Cys konnte in der Gruppe der AD-Patienten eine signifikante Sekretionssteigerung von TNF- α gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden, während sich bei Stimulation mit 100 ng/ml kein Unterschied zwischen beiden Gruppen zeigte. Die Stimulation mit 10 ng/ml Lipoteichonsäure ergab ebenfalls eine höhere Sekretionssteigerung von TNF- α in der Gruppe der AD-Patienten. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Dass sich nach Stimulation mit 25 ng/ml Pam₃Cys ein Unterschied in der TNF- α -Produktion zeigen ließ, jedoch bei Stimulation mit höheren Konzentrationen nicht, kann möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass ab einem gewissen Aktivierungsniveau über einen negativen *Feedback*-Mechanismus die TNF- α -Sekretion gehemmt wird. In anderen Studien war ebenfalls ein Absinken der TNF- α -Konzentration bei Stimulation mit hohen Dosen LTA zu beobachten [94].

Ursache und gleichzeitig methodischer Störfaktor hinsichtlich der beobachteten unterschiedlichen TNF- α -Sekretion könnte eine bereits basal gesteigerte TNF- α -Sekretion bei AD-Patienten sein. Tatsächlich zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe schon ohne Stimulation der Zellen eine geringfügig höhere TNF- α -Sekretion. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Daten einer anderen Gruppe, aus denen ebenfalls keine Unterschiede in der basalen, monozytären TNF- α -Expression zwischen AD-Patienten und gesunden Probanden hervorgingen, unterstützen diese Ergebnisse [87]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete höhere TNF- α -Sekretion nach Stimulation mit PAMPs wie LTA oder Pam₃Cys könnte somit auf die leicht gesteigerte TLR2-Expression in PBMC und Monozyten zurückzuführen sein.

TLR2 ist der verantwortliche Rezeptor für die Erkennung von LTA [39, 94]. Essentiell für die Erkennung von triacylierten Lipoproteinen/Lipopeptiden ist das funktionelle Heterodimer aus TLR2 und -1 [108], wobei neuere Studien zeigen, dass scheinbar auch TLR6 in die Erkennung von triacylierten Lipopeptiden involviert zu sein scheint [41].

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Unterschiede in der TNF- α -Sekretion könnten demzufolge auch durch eine gesteigerte TLR1- und/oder TLR6-Expression bedingt oder zumindest beeinflusst worden sein. TLR1 und -6 wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, jedoch zeigen andere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe tendenziell sogar eher eine verminderte TLR1- und TLR6-Expression in Monozyten von AD-Patienten (*Microarray*; Daten nicht gezeigt).

Aktuelle Studienergebnisse zeigen, dass bei der Erkennung von LTA und Lipopeptiden neben TLR2 auch das Glykoprotein CD14 involviert ist [39-41]. Das bedeutet, dass eine höhere CD14-Expression bei AD-Patienten zu einer stärkeren TNF- α -Sekretion nach Stimulation führen könnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine vergleichenden CD14-Expressionsdaten auf mRNA-Ebene erhoben. Andere Studien konnten aber in Monozyten keinen signifikanten Unterschied von CD14 zwischen Patienten mit atopischer Dermatitis und einer gesunden Kontrollgruppe nachweisen [87]. Bezüglich der Oberflächenexpression von CD14 auf Monozyten kann aufgrund der Daten der vorliegenden Arbeit jedoch eine Aussage getroffen werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden, wobei die Kontrollgruppe sogar tendenziell eher eine diskret stärkere CD14-Expression aufwies als die Patientengruppe (Daten nicht gezeigt). Dass die beobachteten Unterschiede in der TNF- α -Sekretion auf eine unterschiedliche CD14-Expression zurückzuführen sind, ist somit unwahrscheinlich bzw. auszuschließen.

Die gesteigerte TLR2-Expression bei AD-Patienten kann sich, wie hier gezeigt, zum Beispiel in einer erhöhten Sekretionsbereitschaft des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α widerspiegeln. Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden in Monozyten des peripheren Bluts erhoben. Untersuchungen mit Keratinozyten aus chronischen AD-Hautläsionen konnten zeigen, dass Zellen von AD-Patienten nach Stimulation mit dem Th1-Zytokin IFN- γ stärker TNF- α sezernieren als Zellen einer Kontrollgruppe. Interessanterweise zeigen aktuelle Beobachtungen in diesem Zusammenhang, dass Patienten mit schweren, chronischen Hautläsionen von einer systemischen Therapie mit TNF- α -Antagonisten wie *Infliximab* profitieren können [109].

5.3.7 Patienten mit atopischer Dermatitis weisen erhöhte Serum-IgE-Spiegel auf

Bis zu 80% der Patienten mit atopischer Dermatitis weisen erhöhte IgE-Spiegel auf (extrinsische AD), die bei zusätzlich bestehendem allergischem Asthma oder allergischer Rhinokonjunktivitis stärker ausgeprägt

sind und mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren [57]. Immunglobulin E lässt sich normalerweise nur in Spuren im Serum nachweisen. Die Bestimmung des Gesamt-IgE im Rahmen dieser Arbeit ergab signifikant höhere IgE-Serumspiegel in der Gruppe der AD-Patienten als in der Kontrollgruppe. Eine Korrelation zwischen dem Serum-IgE-Spiegel und dem klinischen Schweregrad der Erkrankung (anhand des SCORAD) konnte in dem hier untersuchten Patientenkollektiv jedoch nicht festgestellt werden. In einer anderen Untersuchung wurde kürzlich eine Korrelation zwischen einem Polymorphismus im TLR2-Gen (R753Q) und erhöhten Serum-IgE-Spiegeln bei Patienten mit atopischer Dermatitis gezeigt [71]. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin, wurden in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls Untersuchungen zu Assoziationen zwischen TLR-Polymorphismen und atopischer Dermatitis durchgeführt. Eine Assoziation zwischen TLR2-SNPs und dem Vorliegen einer AD konnten hierbei nicht festgestellt werden.

5.3.8 Kein Unterschied in der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 4 und -9 zwischen AD-Patienten und der Kontrollgruppe

5.3.8.1 *Toll-like* Rezeptor 4

Toll-like Rezeptor 4 wurde als Rezeptor für die durch Lipopolysaccharide (LPS)-induzierte Aktivierung von Immunzellen beschrieben [17]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsprofilen für TLR4 zwischen Patienten mit atopischer Dermatitis und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Sowohl in PBMC als auch bei der zusätzlich untersuchten Subpopulation der Monozyten wiesen beide Gruppen auf mRNA-Ebene vergleichbare Expressionsniveaus auf. Die Ergebnisse decken sich mit Daten einer früheren Untersuchung, in der die Expression von TLR4 in Zellen der Nasenschleimhaut von Personen mit oder ohne eine solche atopische Erkrankung (definiert als: positive Anamnese bezüglich Asthma oder Allergie, positiver Prick-Test) untersucht wurde. Es konnten dort zwar deutliche Unterschiede in der Expression von TLR4 zwischen Kindern und Erwachsenen festgestellt werden, aber es waren keine signifikanten Unterschiede innerhalb der gleichen Altersgruppen zwischen erkrankten und gesunden Probanden nachweisbar [29]. Die in der vorliegenden Arbeit mittels Durchflusszytometrie gemessenen Ergebnisse zur Expression auf Proteinniveau zeigten in beiden Gruppen ebenfalls eine vergleichbare Expression des *Toll-like* Rezeptors 4 auf Monozyten des peripheren Bluts.

Das Vorliegen einer atopischen Dermatitis korreliert, den mRNA- und Proteindaten der vorliegenden Arbeit nach, nicht mit einer quantitativ veränderten TLR4-Expression. Auch bei anderen Erkrankungen scheint die Expression von TLR4 bezüglich der Quantität häufig unbeeinflusst zu bleiben. Daten anderer Studien konnten zeigen, dass bei akuten, systemischen Erkrankungen wie einer durch gram-negative Erreger hervorgerufenen Sepsis als auch bei chronisch-progredienten Erkrankungen wie einer

Leberzirrhose ein vergleichbares TLR4-Expressionsniveau bei Patienten und Kontrollprobanden nachweisbar sein kann [96, 110].

Möglicherweise spiegeln sich Unterschiede nicht zwingend in quantitativ abweichenden Expressionsniveaus, sondern vielmehr in einer veränderten Funktionalität wider. So konnten beispielsweise Tulic et al. zeigen, dass die Stimulation von Nasenschleimhautzellen mit LPS bei gesunden Erwachsenen zu einem Anstieg der TLR4-Expression führte, wohingegen kein Effekt bei Patienten mit atopischer Erkrankung zu beobachten war [29].

Eine mögliche Ursache für eine gestörte Funktionalität von Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionswegen sind Mutationen einzelner Nukleotide, sogenannte *single nucleotide polymorphisms* (SNP) des Rezeptors. Polymorphismen in der extrazellulären Domäne des *Toll-like* Rezeptors 4 wie die Asp299Gly-, Thr399Ile-SNPs sind mit einer abgeschwächten Reaktion auf die Inhalation von LPS assoziiert. Durch die gestörte Signalkaskade kommt es außerdem zu einer verminderten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen [111]. Da der extrazelluläre Anteil des Rezeptors betroffen ist, ist dies möglicherweise die Folge einer geminderten Erkennung potentieller Liganden. In Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, Berlin, wurden, wie bereits erwähnt, Patientenproben in Hinblick auf eine mögliche Assoziation zwischen SNPs und der atopischen Dermatitis untersucht. Eine Assoziation zwischen TLR4-SNPs war jedoch nicht festzustellen.

5.3.8.2 TLR4-Expression in T-Lymphozyten eines Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung von Gesamt-PBMC, Monozyten und B-Lymphozyten gelegt. Exemplarisch wurde bei einigen AD-Patienten und Kontrollprobanden (n= je 2) die TLR-Expression in T-Lymphozyten untersucht. Aufgrund der geringen Fallzahl ist bei diesen Daten jedoch keine Aussage über eine mögliche statistische Signifikanz der Beobachtungen möglich. Im Vergleich zu anderen Subpopulationen von PBMC scheint das Expressionsniveau der *Toll-like* Rezeptoren in T-Lymphozyten deutlich geringer zu sein. Laut den Daten anderer Arbeitsgruppen weisen T-Lymphozyten ein geringes Expressionsniveau der *Toll-like* Rezeptoren 2 und 9 auf und eine noch geringere TLR4-Expression. Lediglich TLR5 wird in T-Lymphozyten in höherem Maße exprimiert [23]. Dies stimmt mit den Daten der vorliegenden Arbeit überein (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wies die Probe eines AD-Patienten mit einem sehr hohen SCORAD (SCORAD = 86,6 entsprechend einer schweren atopischen Dermatitis) im Vergleich zu den anderen Proben eine stärkere TLR4-Expression in T-Lymphozyten auf. Die Expressionsdaten der anderen untersuchten *Toll-like* Rezeptoren und Zellpopulationen entsprachen in etwa den Werten anderer Probanden der Patientengruppe. Der Patient befand sich aufgrund einer akuten Exazerbation seiner Erkrankung in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité, Berlin. Ob der Aktivitätsgrad der Erkrankung in diesem Fall

einen Einfluss auf die Expression von TLR4 in T-Lymphozyten hat, kann aufgrund fehlender Vergleichswerte leider nicht beurteilt werden. Es wäre von hohem Interesse, dieser Frage in weiteren, experimentellen Untersuchungen nachzugehen, wobei sich durchflusszytometrische Analysen mit Ko-Färbungen des T-Zell-Aktivierungsmarkers HLA-DR und TLR4 auf T-Lymphozyten anbieten würden.

5.3.8.3 *Toll-like* Rezeptor 9

B-Lymphozyten sind neben dendritischen Zellen als stark TLR9-exprimierende Zellpopulation beschrieben [23]. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass B-Lymphozyten höhere TLR9-Expressionsraten aufweisen als Monozyten. Ein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Studiengruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden (sowohl in Gesamt-PBMC als auch in B-Lymphozyten und Monozyten). *Toll-like* Rezeptoren werden vor allem mit der angeborenen Immunantwort assoziiert, stellen aber auch ein wichtiges Verbindungsglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität dar. Warum könnte es sinnvoll sein, dass Zellen des adaptiven Immunsystems wie B-Lymphozyten hohe TLR9-Expressionsraten aufweisen? Aktuelle Untersuchungsergebnisse zeigen, dass TLRs eine wichtige Rolle in der Aktivierung naiver B-Zellen spielen. Diese brauchen zur optimalen Aktivierung eine Kombination dreier verschiedener Signale. Das erste Signal ist die Quervernetzung der B-Zell-Rezeptoren durch die Antigenbindung. Dies führt außerdem zu einem raschen Anstieg der TLR9-Expression in diesen Zellen [112]. Das zweite Signal stammt aus der Interaktion zwischen dem CD40-Rezeptor und dem MHC-Klasse II-Molekül der B-Zelle mit dem CD40-Liganden und dem T-Zell-Rezeptor der T-Zelle. Das dritte Signal stammt aus der Stimulation des angeborenen Immunsystems. Die Stimulation von *Toll-like* Rezeptor 9 mit nicht-methylierten CpG-Motiven potenziert die Proliferation, den Isotypenwechsel und die Differenzierung von naiven B-Zellen zu immunglobulinsezernierenden Zellen [113].

Während sich Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Zellpopulationen nachweisen ließen, konnten keine Unterschiede zwischen beiden untersuchten Gesamtgruppen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigen Daten einer anderen Arbeitsgruppe, dass NC/Nga-Mäuse (ein Maus-Modell für atopische Dermatitis) im Vergleich zu einem gesunden Kontrollstamm eine niedrigere TLR9-Expression auf Makrophagen aufweisen. In Hinsicht auf B-Lymphozyten unterschied sich die Expression zwischen beiden Mäusepopulationen jedoch nicht [114]. Da sich die Expression, die Erkennung von Stimuli und die nachfolgende TLR-Aktivierungskaskade zwischen murinen und humanen Zellen jedoch unterscheiden, sind die Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar [115, 116]. Daten zu humanen Zellen liegen diesbezüglich noch nicht vor.