

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2, -4, und -9
in peripheren mononukleären Zellen des Bluts
bei Patienten mit atopischer Dermatitis**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Birgit Kerstin Klages
aus Braunschweig

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Worm
2. Prof. Dr. med. M. Wittmann
3. Prof. Dr. med. K. Asadullah

Datum der Disputation: 10.09.2007

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Die angeborene Immunität	1
1.1.2	Die adaptive Immunität	2
1.2	Toll-like Rezeptoren	2
1.2.1	Humane <i>Toll-like</i> Rezeptoren	3
1.3	Mustererkennende Rezeptoren und Pathogen-assoziierte molekulare Muster	5
1.3.1	Mustererkennende Rezeptoren	5
1.3.2	Pathogen-assoziierte molekulare Muster	6
1.3.2.1	Lipopolysaccharide	6
1.3.2.2	Peptidoglykan	6
1.3.2.3	Lipoteichonsäuren	7
1.3.2.4	Lipoproteine/Lipopeptide	7
1.3.2.5	Mikrobielle DNA, nicht methylierte CpG-Motive	8
1.4	Toll-like Rezeptoren als mustererkennende Rezeptoren	8
1.4.1	Informationsübertragung über die <i>Toll-like</i> Rezeptoren-Signalkaskade	9
1.4.1.1	Der MyD88-abhängige Signalweg	10
1.4.1.2	Der MyD88-abhängige Signalweg/ TIRAP	10
1.4.1.3	Der MyD88-unabhängige Signalweg/ TRIF	10
1.4.1.4	Der MyD88-unabhängige Signalweg/ TRIF/ TRAM	11
1.4.2	<i>Toll-like</i> Rezeptoren: immunmodulierende Verbindungsglieder zwischen angeborener und adaptiver Immunität	11
1.4.3	Regulation der TLR-Expression	12
1.5	Atopische Dermatitis	13
1.6	Hygienehypothese und atopische Erkrankungen	14
1.7	Ansätze zur Prävention und Therapie bei Erkrankungen mit Th1/Th2-Dysbalance	14
2	FRAGESTELLUNG	16
3	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	Probanden und Untersuchungsmaterial	17
3.1.1	AD-Patienten und Kontrollprobanden	17
3.1.2	SCORAD	17
3.2	Labormethoden	18
3.2.1	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	18
3.2.2	Zellzahlbestimmung	18
3.2.3	Magnetische Zellseparation von CD14 ⁺ und CD19 ⁺ Zellen	19
3.2.4	Durchflusszytometrische Messung von Oberflächenantigenen auf Monozyten	21
3.2.5	RNA-Extraktion aus humanen PBMC	24
3.2.6	DNase Verdau	24
3.2.7	Reverse Transkription	24
3.2.8	cDNA-Quantifizierung	25
3.2.9	<i>Real-time</i> PCR mittels TaqMan TM -PCR-Technologie	26
3.2.10	Auswahl der Primer und Sonden	30
3.2.11	Auswahl der Referenzgene (<i>housekeeping genes</i>)	30
3.2.12	Relative Quantifizierung	30
3.2.13	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	31
3.2.14	Stimulationen von Monozyten	32
3.2.14.1	Stimulation mit tri-acyliertem Lipopeptid (Pam-3-Cys)	32
3.2.14.2	Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA) aus <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3.2.15	ELISA zur Bestimmung von humanem Tumor Nekrose Faktor alpha (hTNF- α)	32
3.2.16	Bestimmung des Gesamt Immunglobulin E	33

3.2.17	Bestimmung des spezifischen IgE.....	33
3.3	Auswertung und Statistik	34
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Patienten und Kontrollgruppe	35
4.2	Gesamt-IgE und spezifisches IgE.....	35
4.2.1	Gesamt-IgE.....	35
4.2.2	Spezifisches IgE	35
4.3	Etablierung eines <i>real-time</i> PCR-Systems zur Untersuchung der Expression der <i>Toll-like</i> Rezeptoren 2, -4 und -9	37
4.3.1	Spezifität der Primer.....	37
4.3.2	Optimierung der DNase-Behandlung	39
4.3.3	Optimierung der Reversen Transkription.....	41
4.3.4	Eignung der ausgewählten Referenzgene.....	42
4.4	Expressionsmuster von TLR2, -4 und -9: Expressionsniveaus innerhalb der Gruppen	43
4.4.1	TLR2-Expressionsmuster	44
4.4.2	TLR9-Expressionsmuster	46
4.5	<i>Toll-like</i> Rezeptor 2	49
4.5.1	Expression von TLR2 (mRNA) in PBMC	49
4.5.2	Expression von TLR2 (mRNA) in Monozyten	50
4.5.3	Oberflächenexpression von TLR2 auf CD14 ⁺ Monozyten	52
4.5.4	Stimulationen von Monozyten	54
4.5.4.1	Stimulation mit Pam ₃ Cys	54
4.5.4.2	Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA) von <i>Staphylococcus aureus</i>	57
4.5.5	Korrelation des Schweregrads der atopischen Dermatitis und der TLR2-Expression	58
4.5.6	Korrelation des Alters und der TLR2-Expression	58
4.6	<i>Toll-like</i> Rezeptor 4	59
4.6.1	Expression von TLR4 (mRNA) in PBMC	59
4.6.2	Expression von TLR4 (mRNA) in peripheren Monozyten des Bluts.....	60
4.6.3	Oberflächenexpression von TLR4 auf CD14 ⁺ Monozyten	61
4.7	<i>Toll-like</i> Rezeptor 9	63
4.7.1	Expression von TLR9 (mRNA) in PBMC	63
4.7.2	Expression von TLR9 in B-Lymphozyten und Monozyten	64
5	DISKUSSION	66
5.1	Diskussion der Methodik	66
5.1.1	<i>Real-time</i> PCR und Reverse Transkription	66
5.1.2	Reverse Transkription	67
5.1.3	Referenzgene (<i>housekeeping genes</i>).....	67
5.1.4	Adhärenz	68
5.2	Einflussgrößen	68
5.2.1	Akute Infektionen, schwere systemische Erkrankungen	68
5.2.2	Medikamente	68
5.3	Diskussion der Ergebnisse	70
5.3.1	Monozyten und B-Lymphozyten weisen auf mRNA- und Proteinebene unterschiedliche TLR-Expressionsprofile auf.....	70
5.3.2	Erwachsene Patienten mit atopischer Dermatitis weisen eine gesteigerte TLR2-Expression in PBMC auf.....	70
5.3.2.1	Die Hautbesiedlung mit <i>Staphylococcus aureus</i> als eine mögliche Ursache einer gesteigerten TLR2-Expression	70
5.3.3	Kinder, die in ländlicher Umgebung aufwachsen, weisen veränderte TLR2-Expressionsraten auf.....	71
5.3.4	Alter - eine wichtige Einflussgröße auf die TLR-Expression	72

5.3.5	Toll-like Rezeptoren tragen möglicherweise zur Chronifizierung von Entzündungsreaktionen bei.....	74
5.3.6	Patienten mit atopischer Dermatitis weisen in Monozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine gesteigerte TLR2-Expression auf.....	75
5.3.7	Patienten mit atopischer Dermatitis weisen erhöhte Serum-IgE-Spiegel auf.....	77
5.3.8	Kein Unterschied in der Expression der Toll-like Rezeptoren 4 und -9 zwischen AD-Patienten und der Kontrollgruppe	78
5.3.8.1	Toll-like Rezeptor 4	78
5.3.8.2	TLR4-Expression in T-Lymphozyten eines Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis.....	79
5.3.8.3	Toll-like Rezeptor 9	80
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	81
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	83
8	MATERIALIEN.....	86
8.1	Reagenzien	86
8.1.1	Reagenzien für die Blutentnahme, Isolierung von PBMC, Magnetische Zellseparation und Durchflusszytometrie	86
8.1.2	Reagenzien für die Stimulationen mit Pam-3-Cys und LTA sowie den TNF- α -ELISA	86
8.1.3	Reagenzien für die RNA-Extraktion, DNase-Verdau, Reverse Transkription, cDNA-Quantifizierung und Gelelektrophorese	87
8.1.4	Reagenzien für die <i>real-time</i> -PCR	87
8.1.5	Reagenzien für die Bestimmung von Gesamt-IgE und spezifischem IgE.....	89
8.2	Materialien und Geräte.....	89
8.3	Verwendete Computerprogramme.....	90
9	LITERATUR.....	91
10	LEBENS LAUF	99
11	DANKSAGUNG	101
12	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	102

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

11 Danksagung

Hiermit möchte ich allen aufrichtig danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Margitta Worm, für die Überlassung dieses spannenden Themas und für ihr Interesse am Verlauf der Arbeit. Ihr Engagement und ihre wissenschaftliche Begeisterung waren mir stets eine wichtige Unterstützung. Ich danke Ihr herzlich für ihre konstruktive Kritik und ihre Unterstützung während aller Phasen dieser Arbeit. Dank der hervorragenden Arbeitsbedingungen und des freundschaftlichen Umgangs habe ich mich stets sehr wohl und gut betreut gefühlt. Für die Möglichkeit Teilergebnisse dieser Arbeit im Rahmen einer Konferenz vorzustellen danke ich ihr sehr.

Großer Dank gebührt Herrn Dr. Steffen Mergemeier und Herrn Dr. Matthias Kuhn von der Firma CONGEN Biotechnologie GmbH, Berlin. Ich danke ihnen herzlich für die theoretische und praktische Einführung in die Tricks und Kniffe der *real-time* PCR. Ich danke ihnen sehr für die Aufmerksamkeit, die sie mir und dieser Arbeit entgegen gebracht haben. Ein herzliches Dankeschön gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern von Congen, die mich so freundlich und unkompliziert unterstützt haben.

Herzlich danke ich meinen Freunden Frau Dr. rer. nat. Esther Witsch und Herrn Dr. rer. nat. Hanno Andreas Ludewig. Beide haben mich bereits in vielen wichtigen Phasen meines Lebens begleitet und mich während der Vorbereitungen für diese Arbeit freundschaftlich und fachlich sehr unterstützt.

Ich bedanke mich sehr bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der dermatologischen Forschungslabore, die mir durch ihr Interesse und ihre Hilfsbereitschaft die Arbeit sehr erleichtert haben. Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Schumann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, danke ich für die freundlicherweise zur Verfügung gestellte Lipoteichonsäure. Insbesondere möchte ich Frau Dipl.-Biol. Jana Eckert und Herrn Dipl.-Chem. Gunthard Stübs danken.

Herzlicher Dank gilt allen Patientinnen und Patienten der Atopie-Sprechstunde sowie meinen Freunden und Bekannten, die dazu beigetragen haben, diese Arbeit zu realisieren.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder. Durch ihre Zuneigung, ihren Humor und ihre Geduld haben sie mich und das Gelingen dieser Arbeit stets unterstützt. Bei Charlotte möchte ich mich sehr herzlich für ihre tatkräftige Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit sowie ihr Interesse und ihre moralische Unterstützung bedanken.

Von Herzen danke ich Herrn Jan Kügler. Durch seine ausgleichende Art und seine kritischen Anregungen hat er das Entstehen dieser Arbeit maßgeblich unterstützt und bereichert. Für seine Aufmerksamkeit und Zuneigung danke ich ihm sehr.

12 Erklärung an Eides statt

Ich, Birgit Kerstin Klages, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9 in peripheren mononukleären Zellen des Bluts bei Patienten mit atopischer Dermatitis“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum _____ Unterschrift _____

Birgit Kerstin Klages