

4 Ergebnisse

4.1 Patienten und Kontrollgruppe

Das in die Untersuchung aufgenommene Patientenkollektiv (AD-Patienten) umfasste 27 Patienten im Alter von 19 – 61 Jahren (Mittelwert: 33,9 Jahre) mit der Diagnose einer leichten bis schweren atopischen Dermatitis. Davon waren 17 Personen weiblichen und 10 Personen männlichen Geschlechts. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme lag der mittlere SCORAD-Index (Score zur Bestimmung des klinischen Schweregrades einer atopischen Dermatitis; vgl. Abschnitt 3.1.2) der AD-Patienten bei 49,1 (11,6 bis 86,6). Als Kontrollgruppe wurden gesunde Personen ohne atopische Dermatitis und ohne Typ-I-Sensibilisierung entsprechenden Alters und Geschlechts ausgewählt. Zwischen den beiden Vergleichsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich des Alters ($P = 0,102$) und der Geschlechtsverteilung ($P = 0,886$).

4.2 Gesamt-IgE und spezifisches IgE

Neben dem Untersuchungsschwerpunkt dieser Arbeit, der Expressionsanalyse der *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9, wurden für die Gruppe der AD-Patienten und die Kontrollgruppe Gesamt-IgE und spezifisches IgE im Serum bestimmt.

4.2.1 Gesamt-IgE

Der Mittelwert der Serumspiegel an Gesamt-IgE war in der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert: 62,5 kU/l) signifikant niedriger als bei der Gruppe der AD-Patienten (Mittelwert: 1358,1 kU/l; $P < 0,01$) (Tabelle 5). Da andere Arbeiten eine Korrelation zwischen dem Schweregrad einer atopischen Dermatitis und dem Serum-IgE-Spiegel feststellen konnten, wurden die vorliegenden Patientendaten diesbezüglich untersucht [57]. Eine Korrelation zwischen dem Serum-IgE-Spiegel und dem klinischen Schweregrad der atopischen Dermatitis (anhand des SCORAD) konnte in dem hier untersuchten Patientenkollektiv jedoch nicht festgestellt werden ($r = 0,297$).

4.2.2 Spezifisches IgE

Sowohl bei den AD-Patienten als auch bei der Kontrollgruppe wurden anamnestische Angaben bezüglich des Vorliegens einer Typ-I-Sensibilisierung erhoben. Zusätzlich wurde das spezifische IgE (sIgE) gegen acht der am häufigsten vorkommenden inhalativen Allergene (Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß, Katzenschuppen, Hundepithelien, *Cladosporium herbarum* und *Dermatophagoides pteronyssinus*) im Serum der Probanden bestimmt. In der Gruppe der AD-Patienten wiesen 24 der 27 Patienten eine zusätzliche Typ-I-Sensibilisierung auf. Für Probanden der Kontrollgruppe war das Bestehen einer Typ-I-Sensibilisierung ein Ausschlusskriterium. Der Mittelwert an spezifischem IgE im Serum war

dementsprechend in der Gruppe der AD-Patienten (65,4 kU/l) signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Mittelwert: 0,78 kU/l; $P < 0.01$) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Überblick über beide Studiengruppen

Werte als Mittelwerte angegeben; *Mann-Whitney U Test; ¹Spezifisches IgE gegen Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß, Katzenschuppen, Hundepithelien, Cladosporium herbarum und Dermatophagoide pteronyssinus

	Patienten mit atopischer Dermatitis	Kontrollgruppe	P-Wert
Spezifisches IgE ¹ (in kU/l)	65.4 (<0.35 - >100)	0.78 (< 0.35 - 3.37)	< 0,01*
Gesamt-IgE (in kU/l)	1358.1 (78.1 - >2000)	62.5 (13.3 - 192)	< 0,01*
SCORAD	49.1 (11.6 - 86.6)	---	

4.3 Etablierung eines *real-time* PCR-Systems zur Untersuchung der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsprofile der *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9 von Patienten mit atopischer Dermatitis und hautgesunden Probanden auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und auf mRNA-Ebene mittels *real-time*-PCR untersucht. Hierzu konnte ein entsprechendes PCR-System im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden.

4.3.1 Spezifität der Primer

In Vorversuchen wurde zunächst überprüft, ob mit den gewählten Primer-Sonden-Systemen ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden kann. Hierzu wurde eine PCR mit der cDNA der Positivkontrolle (cDNA aus PBMC eines *buffy-coats*) als Proben-DNA und dem jeweiligen Primerpaar und der Sonde durchgeführt. Bei der gewählten Temperatur von 62°C für die Anlagerung der Primer und Sonden erhielt man jeweils nur ein PCR-Produkt, dessen Größe auf einem 2%igen Agarosegel überprüft wurde und das mit der erwarteten Größe übereinstimmte (Abbildung 7). Die Spezifität der Primer konnte damit nachgewiesen werden. In Tabelle 6 sind die zu erwartenden Größen der PCR-Produkte der jeweiligen Transkripte aufgeführt.

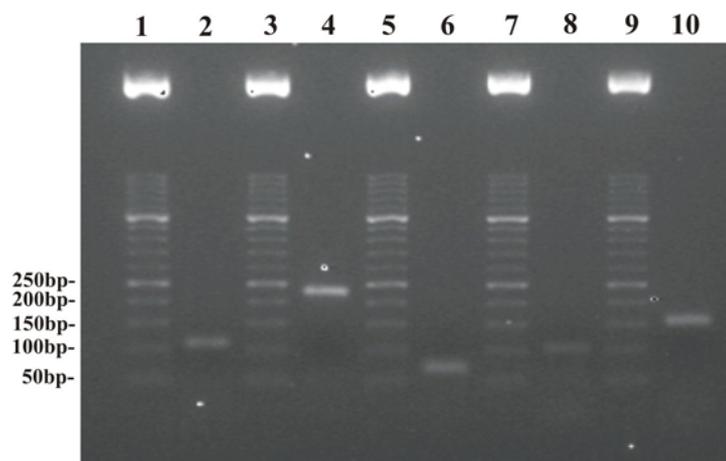


Abbildung 7: Kontrolle der Spezifität der Primerpaare und der Größe des PCR-Produkts

PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Bahnen 1, 3, 5, 7 und 9: 50 bp-DNA-Standard; Bahn 2: PCR-Produkt β_2 -Mikroglobulin mit dem Primerpaar β_2 M for/rev; Bahn 4: PCR-Produkt GAPDH mit dem Primerpaar GAPDH for/rev; Bahn 6: PCR-Produkt TLR2 mit dem Primerpaar TLR2 for/rev; Bahn 8: PCR-Produkt TLR4 mit dem Primerpaar TLR4 II for/rev; Bahn 10: PCR-Produkt TLR9 mit dem Primerpaar TLR9 for/rev; *bp*, Basenpaare.

Tabelle 6: Größe der spezifischen PCR-Produkte

bp, Basenpaare

Transkript	PCR-Produkt [bp]
<i>Toll-like</i> Rezeptor 2	66
<i>Toll-like</i> Rezeptor 4	98
<i>Toll-like</i> Rezeptor 9	150
β_2 -Mikroglobulin	111
Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	225

4.3.2 Optimierung der DNase-Behandlung

In der Regel sollten Primer so gestaltet sein, dass der amplifizierte DNA-Abschnitt über eine Intron-Exon-Grenze reicht. So wird ausgeschlossen, dass in der PCR genomische DNA ebenfalls amplifiziert wird. Da bei einigen der hier verwendeten PCR-Systeme dieses Kriterium nicht erfüllt werden konnte, musste sichergestellt werden, dass die extrahierte Gesamt-RNA frei von genomischer DNA war. Um dies zu kontrollieren, wurden die extrahierten RNA-Proben nach entsprechendem DNase Verdau als Ausgangsmaterial in eine PCR eingesetzt. Normalerweise dürfte, wenn es sich um kontaminationsfreie RNA handelt, kein PCR-Produkt entstehen. Anfangs wurde der DNase Verdau während der Extraktion der Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) direkt auf den Präparationssäulen, entsprechend der Empfehlungen des Herstellers, mit dem RNase Free DNase Set von Qiagen durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass nach diesem Procedere noch geringe Mengen genomischer DNA in der RNA-Probe enthalten waren (Abbildung 8). Durch Einsatz von mehr DNase oder weniger Ausgangsmaterial (PBMC, Monozyten, B-Lymphozyten) konnte keine Verbesserung des Ergebnisses erzielt werden. Deshalb wurde nach Extraktion der RNA ein zusätzlicher externer DNase-Verdau angeschlossen. Der externe DNase-Verdau erfolgte mit einer DNase I der Firma Invitrogen, die nach dem Verdau inaktiviert wurde, um zu verhindern, dass die neuentstehende cDNA während der anschließenden Reversen Transkription verdaut werden würde. Nach dem zusätzlichen externen DNase-Verdau waren die RNA-Proben frei von genomischer DNA (Abbildung 8). In der folgenden Abbildung ist der Unterschied zwischen dem ursprünglich durchgeführten Procedere zum Verdau genomischer DNA und dem endgültigen Procedere mit einem zusätzlichen externen DNase-Verdau dargestellt.

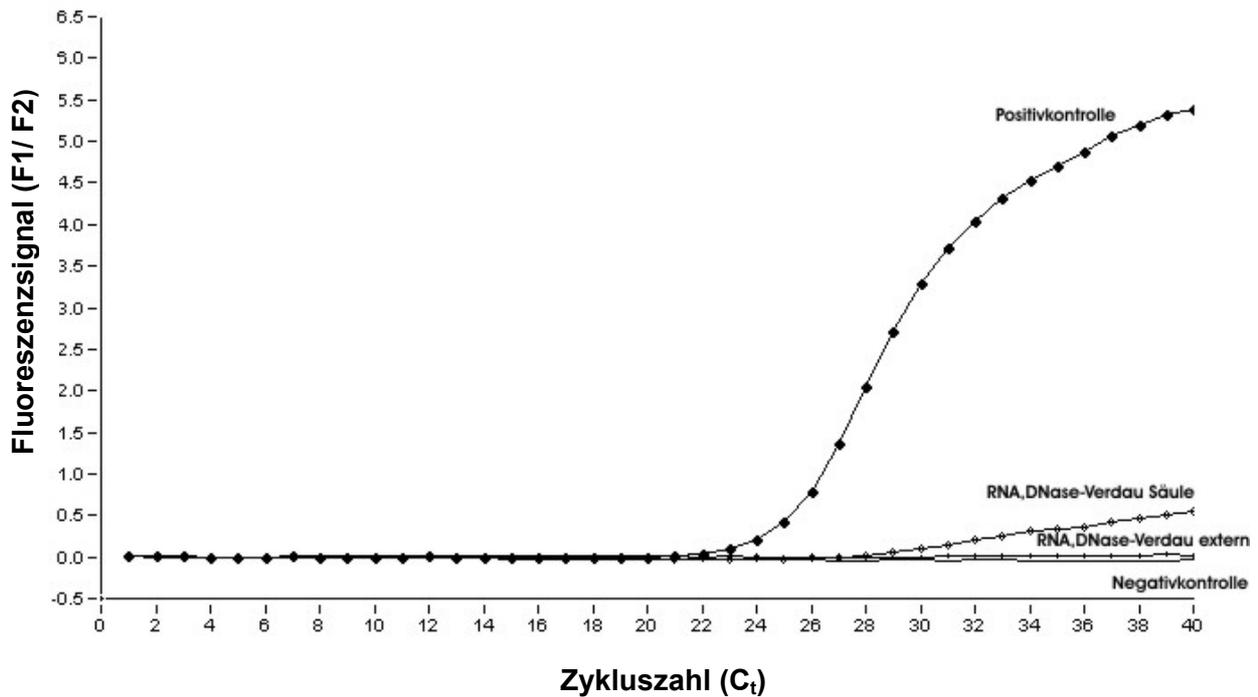


Abbildung 8: PCR-Kontrolle nach unterschiedlicher DNase-Behandlung

Dargestellt ist die Zykluszahl (x-Achse) gegenüber dem gemessenen Fluoreszenzsignal (y-Achse). Vergleichend wurde RNA als Probenmaterial in die PCR eingesetzt, bei der ein DNase-Verdau nur auf der Säule mit RNase Free DNase Set (QIAGEN, Hilden) durchgeführt wurde (Linie mit Ellipsen) und RNA, die nach RNA-Isolierung einem zusätzlichen externen DNase-Verdau mit einer DNase I (Invitrogen, Mannheim) unterzogen wurde (gestrichelte Linie). Gleichzeitig wurden eine Negativkontrolle (einfache Linie) und eine Positivkontrolle (Linie mit schwarzen Vierecken) durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von 4.

4.3.3 Optimierung der Reversen Transkription

Um die *real-time* PCR in einem Bereich optimaler Effizienz durchführen zu können, wurden verschiedene Reagenzien für die Reverse Transkription miteinander verglichen. Es wurden drei verschiedene Reverse Transkriptasen [(AMV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim), SuperScript™ II (Invitrogen-Life Technologies, Mannheim) und Omniscript™ Reverse Transkriptase (Qiagen, Hilden)] zur Umschreibung von mRNA in cDNA (*complementary* DNA) geprüft und der Einsatz von Oligo-dT-Primern, Random Hexamer-Primern und spezifischen Primern getestet. Die genauen Bedingungen der Reversen Transkription sind detailliert unter 3.2.7 beschrieben.

Die erhaltene cDNA wurde in einer anschließenden PCR als Ausgangsmaterial eingesetzt. Es zeigte sich, dass ausgehend von der selben Menge Gesamt-RNA die C_t -Werte der verschiedenen Proben je nach verwendeter Reverser Transkriptase um bis zu 5,9 Zyklen variierte. Die Reverse Transkription erfolgte nachfolgend in dieser Arbeit mit der *Omniscript* Reverser Transkriptase der Firma Qiagen. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der PCR mit den verschiedenen RT-Produkten dargestellt.

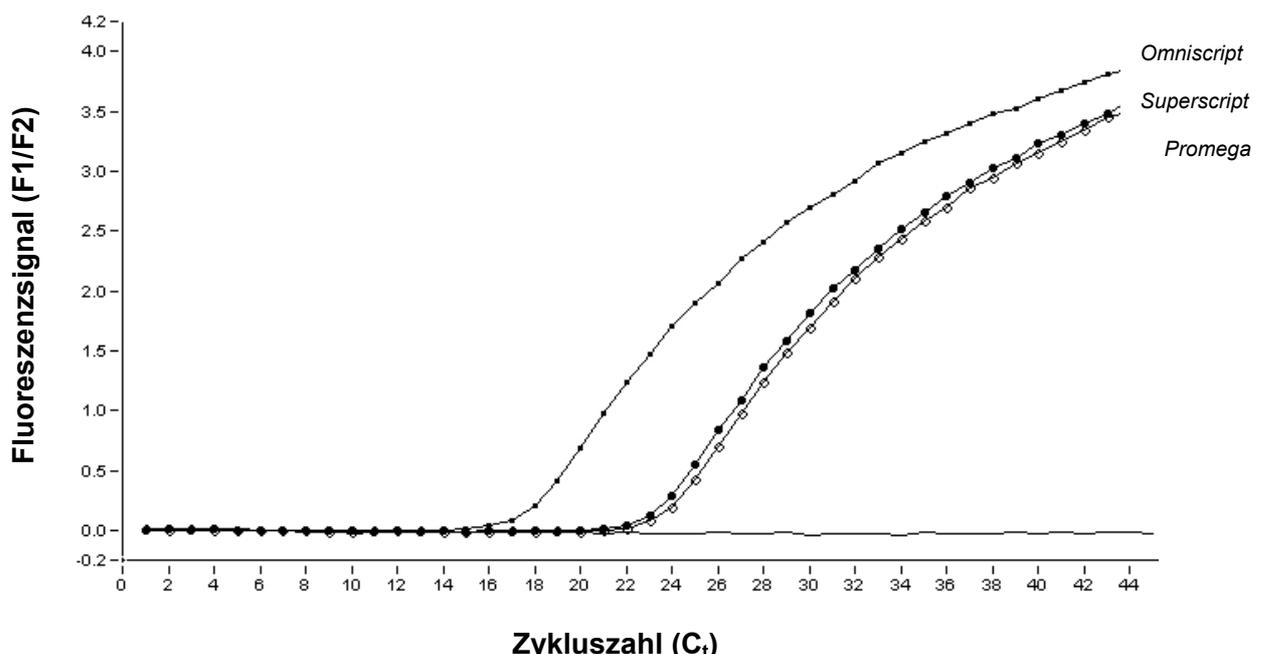


Abbildung 9: Vergleich verschiedener Reverser Transkriptasen

Nach Umschreiben gleicher Mengen Gesamt-RNA in cDNA mit Hilfe verschiedener Reverser Transkriptasen wurden jeweils 20ng cDNA als Probenmaterial in eine PCR eingesetzt. Untersucht wurden drei verschiedene Reverse Transkriptasen (*AMV RT Promega*, *SuperScript™ II Invitrogen-Life Technologies*, *Omniscript™ RT Qiagen*). Für die weiteren Untersuchungen wurde die Reverse Transkriptase *Omniscript* ausgewählt, da mit ihr ein deutlich besseres Ergebnis erzielt wurde. Der Zyklus, in dem sich das spezifische Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundsignal hervorhebt, wird als der *Cycle of threshold* (C_t) bezeichnet. Je niedriger der C_t -Wert, desto höher ist das Expressionsniveau des Zielgens in der Probe.

4.3.4 Eignung der ausgewählten Referenzgene

In der Literatur werden bei der Untersuchung von Expressionsprofilen in PBMC die Referenzgene GAPDH und β_2 -Mikroglobulin empfohlen [81]. Bei der Kontrolle der Einsetzbarkeit der beiden Gene als Referenzgene konnte eine sehr geringe Schwankung der Expressionsrate zwischen den untersuchten Proben der Patienten- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsrate feststellbar, so dass beide ausgewählten Gene als geeignete Kontrollgene eingestuft werden konnten (β_2 M: $P= 0,630$; GAPDH: $P= 0,563$).

4.4 Expressionsmuster von TLR2, -4 und -9: Expressionsniveaus innerhalb der Gruppen

Neben den erhobenen Daten zum Vergleich der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9 zwischen Patienten mit atopischer Dermatitis und einer Kontrollgruppe lassen sich zunächst allgemeine Aussagen zur Expression der untersuchten Rezeptoren treffen. Die Expressionsprofile der untersuchten *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9 variieren zwischen den verschiedenen Zellpopulationen. So ist beispielsweise eine starke TLR2-Expression charakteristisch für Monozyten, während B-Lymphozyten eine hohe TLR9-Expression aufweisen (Abbildung 10).

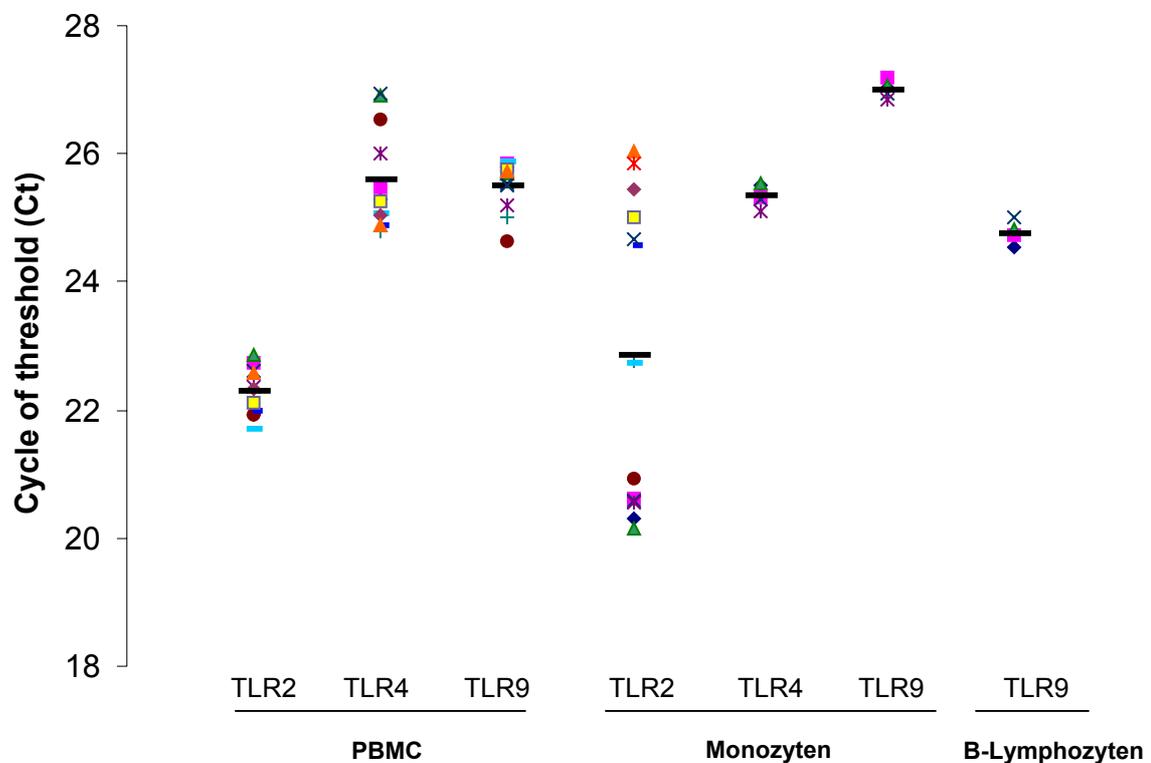


Abbildung 10: Ergebnisse der *real-time* PCR im Überblick

Dargestellt sind die Ergebnisse der untersuchten *Toll-like* Rezeptoren 2, -4 und -9 in den verschiedenen Zellpopulationen (PBMC, Monozyten und B-Lymphozyten). Exemplarisch sind die Ergebnisse der AD-Patienten dargestellt. Der *Cycle of threshold* (Ct) entspricht dem Zyklus der PCR, in dem das Fluoreszenzsignal das unspezifische Hintergrundsignal übersteigt. Je niedriger der Ct-Wert ist, desto mehr cDNA des untersuchten Zielgens ist in der Probe. Mittelwert: -.

4.4.1 TLR2-Expressionsmuster

Monozyten zeichnen sich durch eine starke TLR2-Expression aus. Im Vergleich zu TLR2 ist die TLR4- und TLR9-Expression deutlich schwächer. Dieses Expressionsmuster ließ sich in beiden Probandengruppen feststellen. Anhand der Durchflusszytometriedaten lässt sich dies ebenfalls für die Proteinebene nachvollziehen: Auch auf der Oberfläche exprimieren Monozyten stärker TLR2 als TLR4. In den folgenden Abbildungen sind exemplarisch die Daten der AD-Patienten dargestellt (Abbildung 11 und 12).

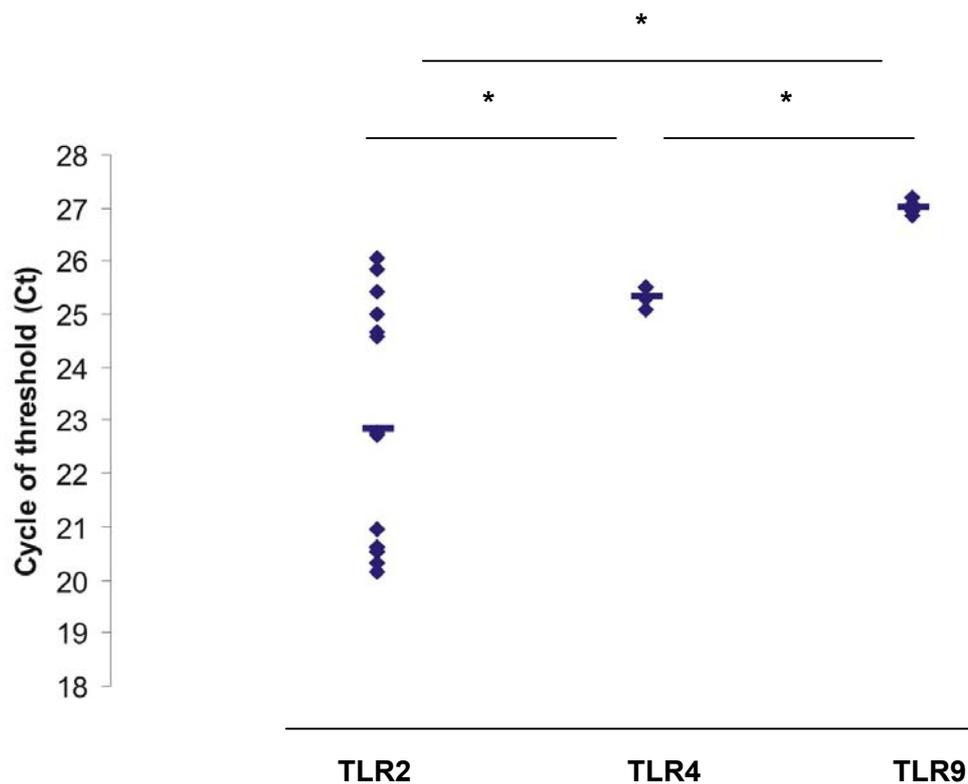


Abbildung 11: Expressionsunterschiede von TLR2, -4 und -9 in Monozyten des peripheren Bluts

Dargestellt sind die Ergebnisse der mittels *real-time* PCR durchgeführten Untersuchung zur Expression von TLR2, -4 und -9 in Monozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis. Der C_t -Wert (Schwellenwert) entspricht dem Zyklus der PCR, bei dem das Signal der Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die kleinen Querbalken markieren die jeweiligen Mittelwerte (TLR2: 22,87; TLR4: 25,35; TLR9: 27,01). Je niedriger der C_t -Wert ist, desto mehr cDNA des Zielgens war zu Beginn in der PCR-Probe. *: $P < 0.05$.

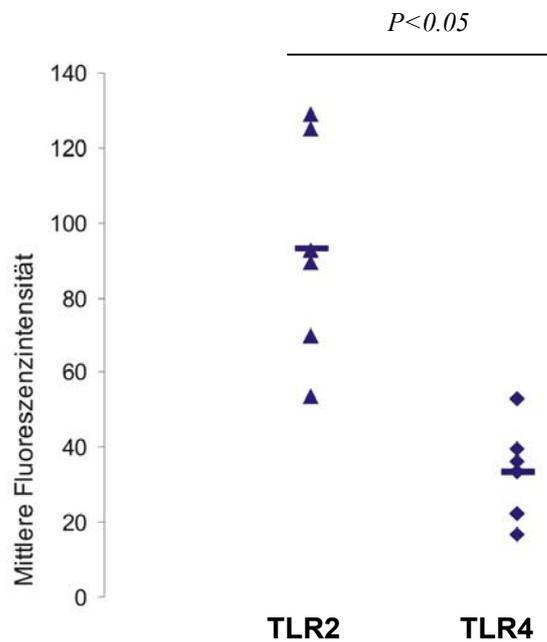


Abbildung 12: Vergleich der Oberflächenexpression von TLR2 und -4 auf CD14⁺ Monozyten

Dargestellt sind die mittels Durchflusszytometrie erhobenen Daten zur Expression der TLR2 und -4 auf der Zelloberfläche von Monozyten des peripheren Bluts bei Patienten mit atopischer Dermatitis (n=6). Tote Zellen wurden durch die Zugabe von Propidiumjodid aus der Messung ausgeschlossen. Es wurden jeweils 50 000 Zellen ausgewertet. *: $P < 0.05$. Mittelwert: -.

4.4.2 TLR9-Expressionsmuster

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass B-Lymphozyten im Vergleich zur Monozyten-Subpopulation eine deutlich höhere TLR9-Expression aufweisen. Dieses Expressionsverhältnis konnte sowohl in den Proben der Kontrollgruppe als auch in denen der AD-Patienten festgestellt werden. In Abbildung 13 sind am Beispiel der Kontrollgruppe die Mittelwerte der C_t -Werte der *real-time* PCR für TLR9 in B-Lymphozyten (C_t : 25,4) und Monozyten (C_t : 28,5) dargestellt. Der C_t -Wert entspricht dem Zyklus der PCR, bei dem das Signal der Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Je niedriger der C_t -Wert ist, desto mehr cDNA des Zielgens war zu Beginn in der Probe. Der Expressionsunterschied erreichte jedoch keine Signifikanz ($P=0,465$).

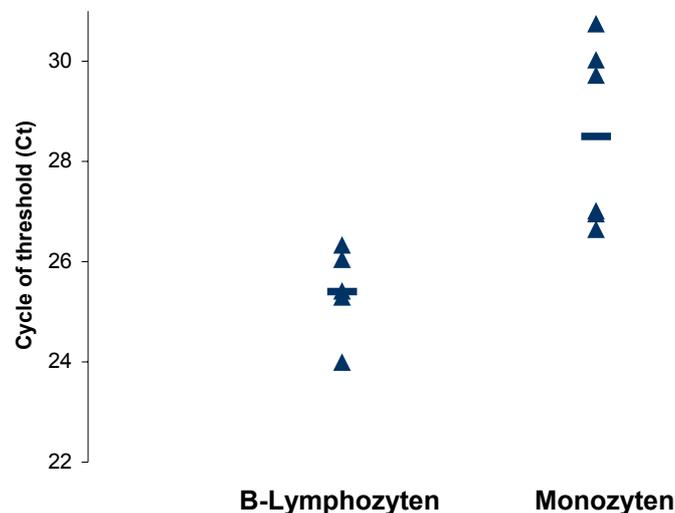


Abbildung 13: Vergleich der Expression von TLR9 in B-Lymphozyten und Monozyten

Vergleichend dargestellt sind die Ergebnisse der *real-time* PCR für den *Toll-like* Rezeptor 9 in B-Lymphozyten und Monozyten. Die gezeigten Daten umfassen die Ergebnisse von 5 (B-Lymphozyten) beziehungsweise 6 (Monozyten) Probanden der Kontrollgruppe. Der C_t -Wert (*Cycle of threshold*) entspricht dem PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die kleinen Querbalken markieren die jeweiligen Mittelwerte (TLR9 in B-Lymphozyten: 25,4; TLR9 in Monozyten: 28,5). Je niedriger der C_t -Wert, desto höher ist das Expressionsniveau des Zielgens.

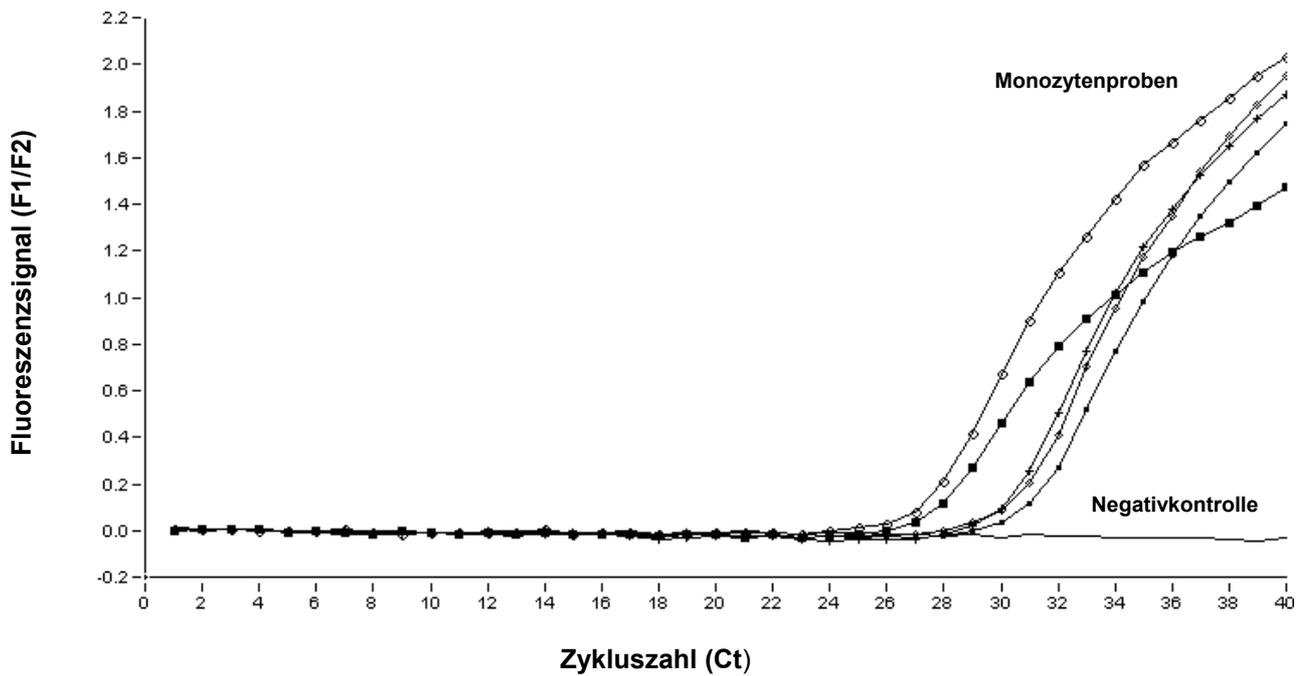


Abbildung 13a: TLR9-Expression in Monozyten

Dargestellt sind die Ergebnisse der *real-time* PCR für den *Toll-like* Rezeptor 9 in Monozyten. Der C_t -Wert entspricht dem PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Je niedriger der C_t -Wert, desto höher ist das Expressionsniveau des Zielgens. Die gezeigten Daten umfassen die Ergebnisse der Monozyten von 5 Probanden der Kontrollgruppe.

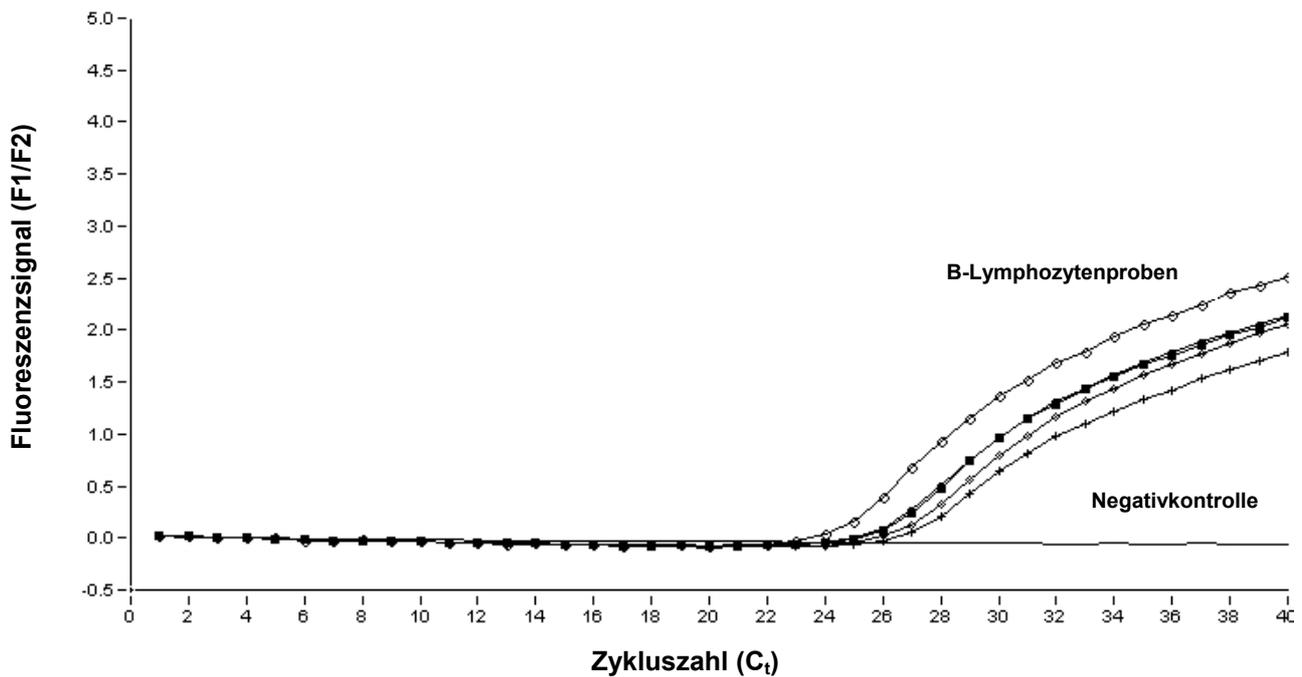


Abbildung 13b: TLR9-Expression in B-Lymphozyten

Dargestellt sind die Ergebnisse der *real-time* PCR für den *Toll-like* Rezeptor 9 in B-Lymphozyten. Der C_t -Wert entspricht dem PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Je niedriger der C_t -Wert, desto höher ist das Expressionsniveau des Zielgens. Die gezeigten Daten umfassen die Ergebnisse der B-Lymphozyten von 5 Probanden der Kontrollgruppe.

4.5 Toll-like Rezeptor 2

4.5.1 Expression von TLR2 (mRNA) in PBMC

Die Expression von TLR2-mRNA in peripheren mononukleären Zellen des Bluts (PBMC) wurde bei jeweils 12 Probanden pro Gruppe untersucht. Die Gruppe der AD-Patienten wies eine 1,39fach höhere TLR2-Expression als die Kontrollgruppe auf (Abbildung 14b). Der relative Expressionsunterschied erreichte statistische Signifikanz. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens (TLR2) zunächst auf ein konstant exprimiertes Referenzgen (β_2 -Mikroglobulin) normalisiert (Delta C_t : TLR2 - β_2M = 6,46 vs. 6,93; $P < 0.05$; Abbildung 14a). Der relative Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen lässt sich entsprechend der $\Delta\text{-}\Delta C_t$ -Methode ermitteln (vgl. Abschnitt 3.2.12).

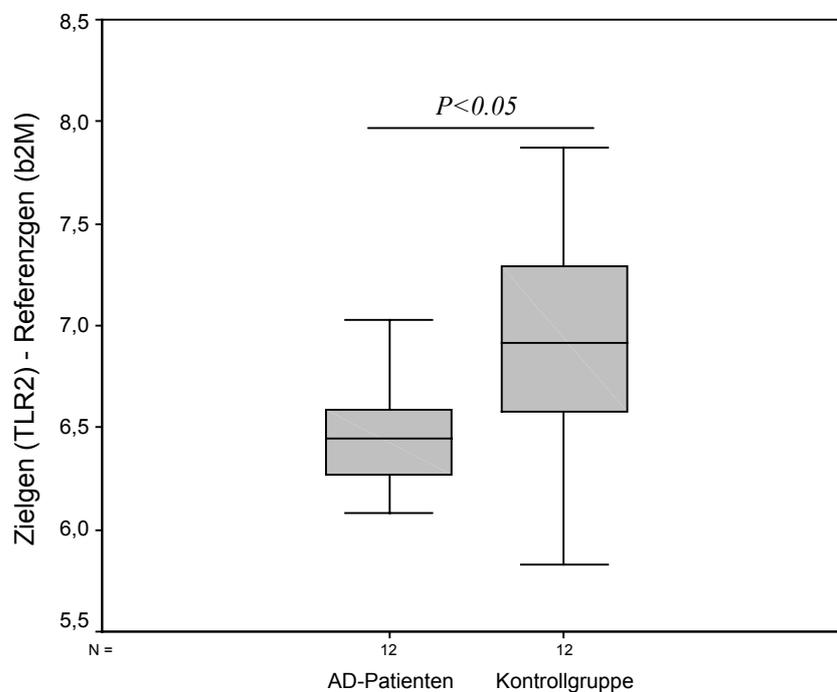


Abbildung 14a: Expression des Toll-like Rezeptors 2 in PBMC

Die Expression von TLR2 wurde bei Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) und einer Kontrollgruppe (KO) in peripheren mononukleären Zellen des Bluts mittels *real-time* PCR gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 12 Probanden pro Gruppe. Um methodische Einflüsse herauszurechnen wurde auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin normalisiert (ΔC_t : Zielgen-Referenzgen). *N*: Anzahl.

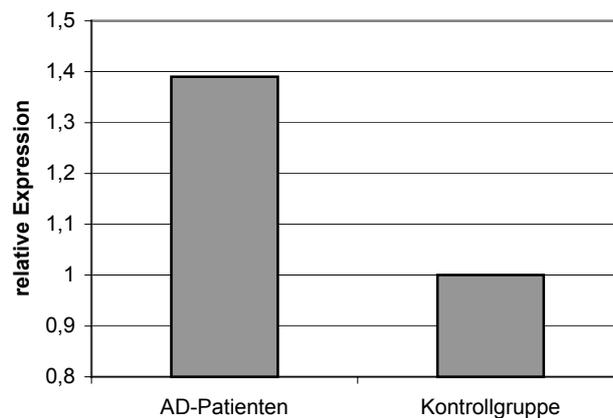


Abbildung 14b: Expression des *Toll-like* Rezeptors 2 in PBMC

Dargestellt ist der relative Expressionsunterschied von TLR2 zwischen beiden Gruppen ($\Delta\Delta\text{-}C_t$ -Methode). Die relative TLR2-Expressionsstärke wurde mittels *real-time* PCR gemessen. Die Expression der Kontrollgruppe wurde =1 gesetzt.

4.5.2 Expression von TLR2 (mRNA) in Monozyten

Monozyten sind, verglichen mit anderen Subpopulation von PBMC, als die am stärksten TLR2-exprimierenden Zellen beschrieben worden [23]. Die TLR2-Expression in Monozyten wurde bei je 14 AD-Patienten und Kontrollprobanden untersucht. In Monozyten zeigte sich, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine circa doppelt so starke relative TLR2-Expression in der Gruppe der AD-Patienten (Abbildung 15b). Die Ergebnisse der durchgeführten *real-time* PCR unterstützten damit die in Gesamt-PBMC erhobenen Daten. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Normalisiert wurde auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin ($\Delta\Delta C_t$: TLR2 - $\beta_2\text{M}$ = AD 4,25 vs. KO 5,27; $P= n.s.$) (Abbildung 15a).

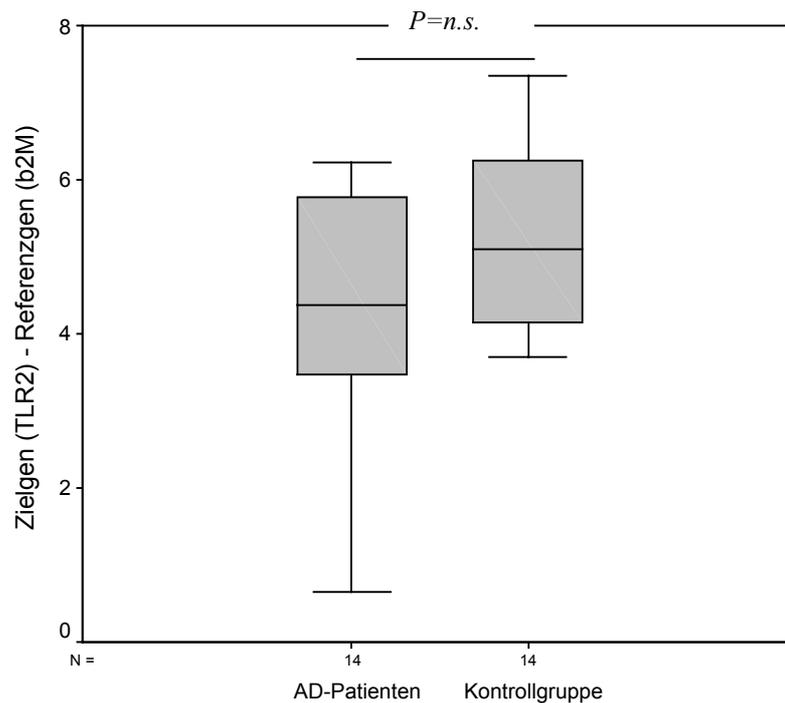


Abbildung 15a: TLR2-Expression in Monozyten

Mittels *real-time* PCR wurde die TLR2-Expression in peripheren Monozyten des Bluts untersucht. Die Monozyten wurden mit Hilfe von CD14 *MicroBeads* (Miltenyi) aus Gesamt-PBMC separiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 14 Probanden pro Gruppe. Normalisiert wurde auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin (Δ -C_t: Zielgen-Referenzgen). *n.s.*: nicht signifikant.

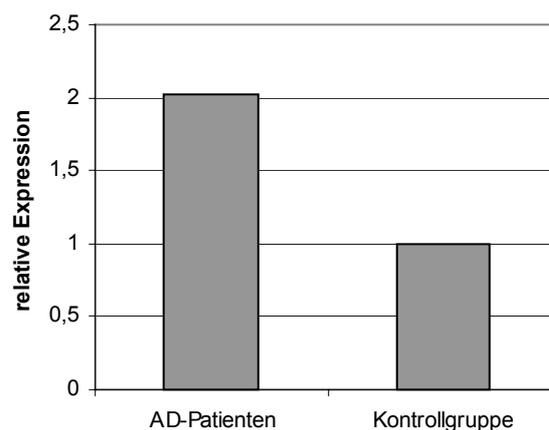


Abbildung 15b: TLR2-Expression in Monozyten

Dargestellt ist der relative Expressionsunterschied von TLR2 zwischen beiden Gruppen. Die relative TLR2-Expressionsstärke wurde mittels *real-time* PCR gemessen und entsprechend der Δ - Δ -C_t-Methode berechnet. Die Expression der Kontrollgruppe wurde =1 gesetzt.

4.5.3 Oberflächenexpression von TLR2 auf CD14⁺ Monozyten

Neben der Untersuchung der TLR2-Expression auf mRNA-Ebene wurde die Oberflächenexpression auf positiv-sortierten peripheren Monozyten des Bluts mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Proteindaten unterstützten die in Gesamt-PBMC und Monozyten erhobenen Daten auf mRNA-Ebene: Die Gruppe der AD-Patienten zeigte ebenfalls eine tendenziell höhere Oberflächenexpression des *Toll-like* Rezeptors 2 auf CD14⁺ Monozyten (Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensität, MFI: 93,1) als die Kontrollgruppe (Mittelwert MFI: 68,3). Der Unterschied zwischen beiden Gesamtgruppen erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($P= 0,240$). Als Nebenbefund zeigte sich eine breitere Streuung der Messdaten für die Oberflächenexpression von TLR2 bei den sechs Kontrollprobanden als bei den sechs AD-Patienten. In Abbildung 16 und 17 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrisch bestimmten Oberflächenexpression von TLR2 dargestellt.

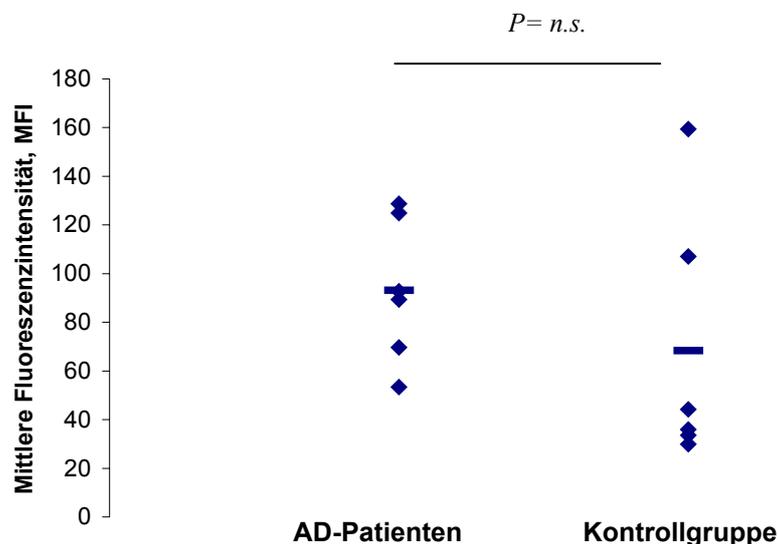


Abbildung 16: Oberflächenexpression von TLR2 auf CD14⁺ Monozyten

Die Oberflächenexpression von TLR2 und CD14 wurde auf unstimulierten Monozyten des Bluts mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 6 Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) und 6 Probanden der Kontrollgruppe. TLR2 wurde mit einem FITC-gekoppelten, CD14 mit einem PerCP-gekoppelten, monoklonalen Antikörper gefärbt. *MFI*: Mittlere Fluoreszenzintensität; *Mittelwert*: - .

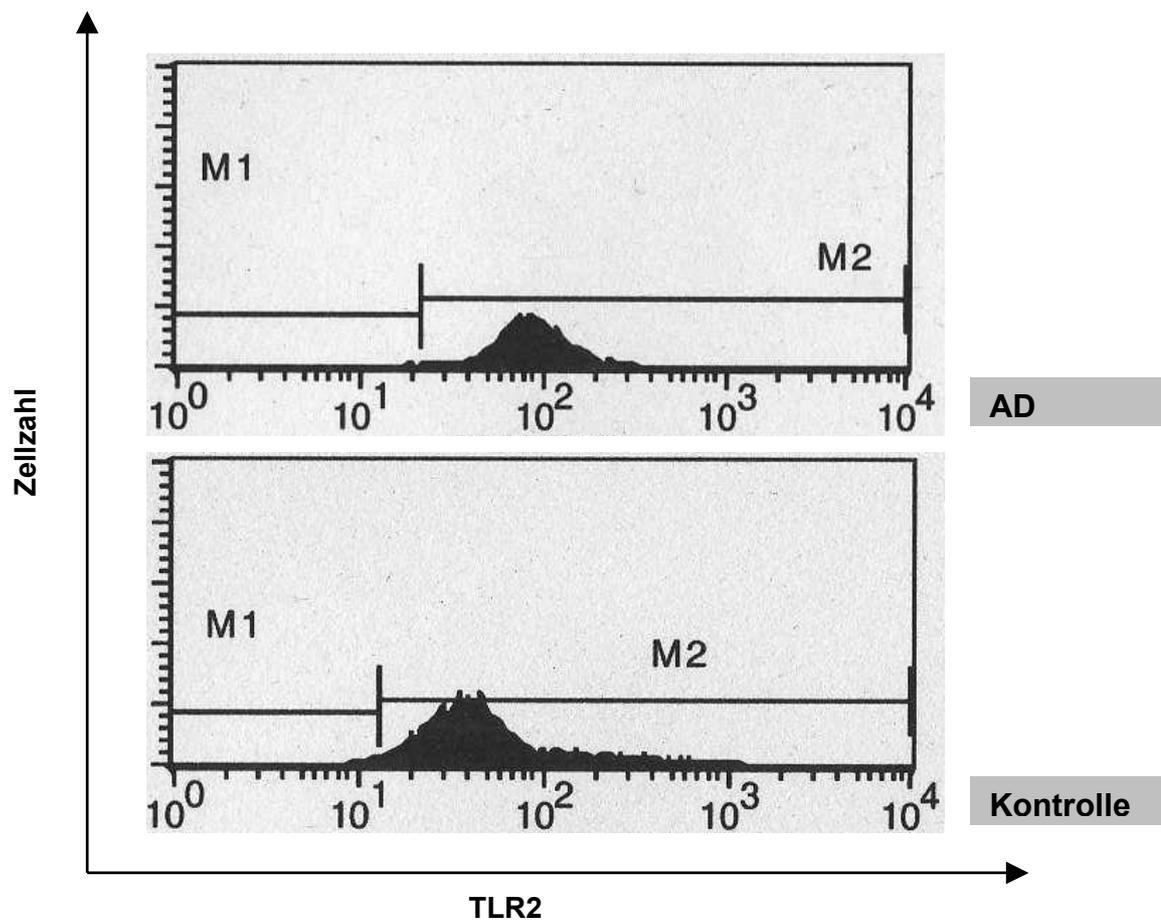


Abbildung 17: Oberflächenexpression von TLR2 auf CD14⁺ Monozyten

Dargestellt sind in Histogrammform jeweils die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der TLR2-Oberflächenexpression auf CD14⁺ Monozyten. Abgebildet ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der TLR2⁺CD14⁺positiven Zellpopulation (Population unter dem Marker M2). Das unspezifische Hintergrundsignal (Marker M1) sowie Fluoreszenzsignale toter Zellen sind aus der Analyse ausgeschlossen. X-Achse: TLR2-FITC; Y-Achse: Zellzahl. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs von jeweils sechs Probanden pro Gruppe (AD-Patienten/Kontrollprobanden: n= je 6). AD: Patienten mit atopischer Dermatitis.

4.5.4 Stimulationen von Monozyten

Die Untersuchung der TLR2-Expression auf mRNA- und Proteinebene ergab unterschiedliche Expressionsraten bei Patienten mit atopischer Dermatitis und der gesunden Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 noch einmal kurz zusammengefasst.

Tabelle 7: Übersicht über die ermittelten TLR2-Expressionsprofile.

AD: Patienten mit atopischer Dermatitis; KO: Kontrollprobanden; n.s.: nicht signifikant.

	Expressionsraten	relatives Expressionsverhältnis (AD : KO)	Signifikanz
TLR2 in PBMC (mRNA)	AD > KO	1,39 : 1,0	$P < 0,05$
TLR2 in Monozyten (mRNA)	AD > KO	2,02 : 1,0	$P = \text{n.s.}$
TLR2 auf Monozyten (Protein)	AD > KO		$P = \text{n.s.}$

Um zu überprüfen, ob sich das unterschiedliche Expressionsniveau von TLR2 in den beiden Gruppen funktionell auswirkt, wurden Monozyten von AD-Patienten und Kontrollprobanden mit TLR2-Liganden stimuliert.

4.5.4.1 Stimulation mit Pam₃Cys

Lipoproteine/Lipopeptide sind Bestandteil der bakteriellen Zellwand. Für Stimulationsversuche kann man synthetische Lipopeptidanaloga verwenden, die den für die Zellaktivierung relevanten N-terminalen Abschnitt (N-acyl-S-diacylglyceryl Cystein) aufweisen. Aus PBMC isolierte Monozyten (5 AD-Patienten und 5 Kontrollprobanden) wurden vier Stunden mit Medium (Basalwert), 25 ng/ml oder 100 ng/ml Pam₃Cys, einem tri-acylierten Lipopeptid, stimuliert. Mittels eines ELISAs wurde anschließend die TNF- α -Konzentration im Zellüberstand bestimmt und die Steigerung der TNF- α -Sekretion nach Stimulation gegenüber dem Basalwert verglichen.

Die basale TNF- α -Sekretion (unstimulierte Monozyten) war in der Gruppe der AD-Patienten höher als bei der Kontrollgruppe. Der Unterschied erreichte keine statistische Signifikanz (Daten nicht gezeigt).

Bei Stimulation mit 25 ng/ml Pam₃Cys konnte in der Gruppe der AD-Patienten eine höhere Induktion von TNF- α (Mittelwert: 2,05fach) gegenüber der Gruppe der Kontrollprobanden (Mittelwert: 1,08fach) festgestellt werden. Der Unterschied erreichte statistische Signifikanz ($P < 0,05$) (Abbildung 18).

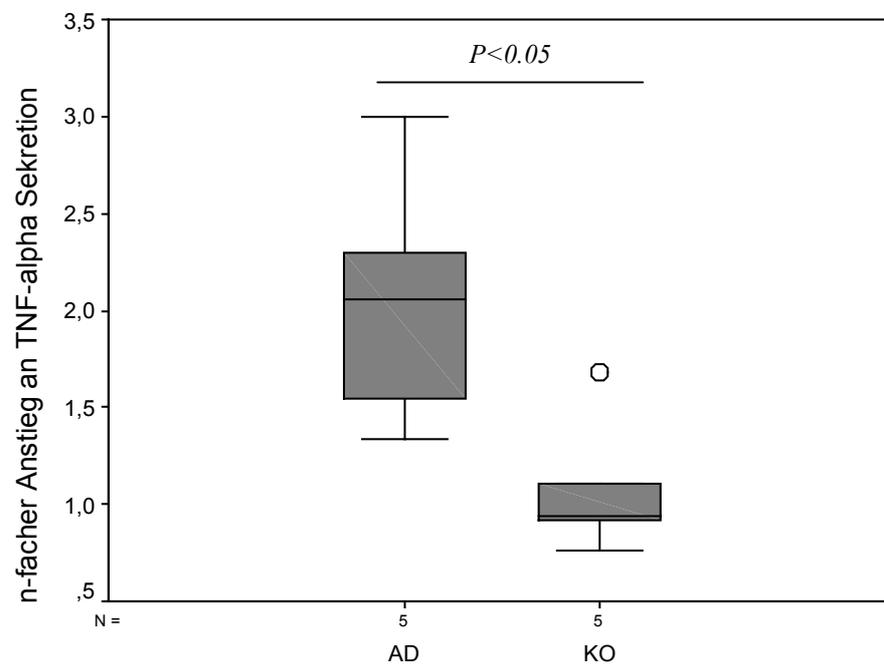


Abbildung 18: Induktion von TNF- α in Monozyten nach Stimulation mit Pam₃Cys

Nach vierstündiger Stimulation mit 25 ng/ml Pam₃Cys oder Medium als Basalwert wurde aus dem Überstand von je 3×10^4 Monozyten die sezernierte TNF- α -Konzentration mittels eines ELISAs bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5 Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) und 5 Kontrollprobanden (KO). *N*: Anzahl.

Bei Stimulation mit 100 ng/ml Pam₃Cys konnte kein Unterschied zwischen beiden untersuchten Gruppen festgestellt werden (Mittelwert AD-Patienten vs. Kontrollen: 1,88fach vs. 1,71fach; $P=n. s.$) (Abbildung 19).

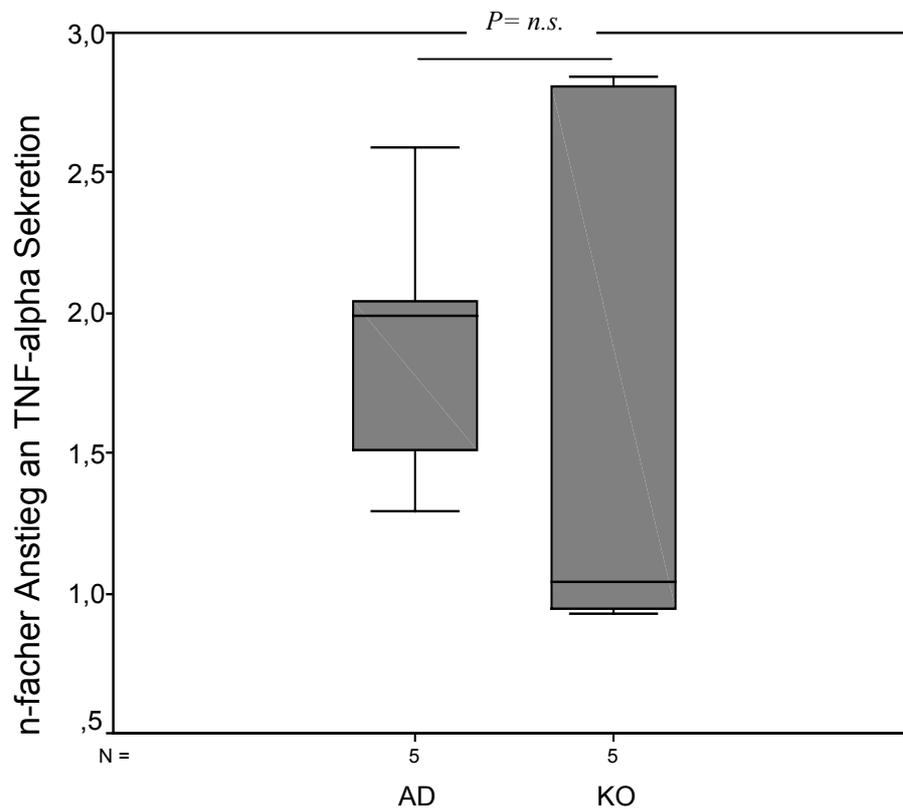


Abbildung 19: Induktion von TNF- α in Monozyten nach Stimulation mit Pam₃Cys

Nach vierstündiger Stimulation mit 100 ng/ml Pam₃Cys oder Medium als Basalwert wurde aus dem Überstand von je 3×10^4 Monozyten die sezernierte TNF- α -Konzentration mittels eines ELISAs bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5 Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) und 5 Kontrollprobanden (KO). N : Anzahl.

4.5.4.2 Stimulation mit Lipoteichonsäure (LTA) von *Staphylococcus aureus*

In einer nächsten Versuchsreihe wurden CD14⁺ Monozyten (3 AD-Patienten und 3 Kontrollprobanden) mit einem weiteren TLR2-Liganden, Lipoteichonsäure aus *Staphylococcus aureus*, stimuliert. Die Monozyten wurden vier Stunden mit Medium (Basalwert) oder 10 ng/ml Lipoteichonsäure stimuliert. Im Anschluss wurde mittels eines ELISAs die TNF- α Konzentration im Zellüberstand bestimmt und die Steigerung der TNF- α -Sekretion nach Stimulation mit dem Basalwert verglichen.

Bei Stimulation mit 10 ng/ml Lipoteichonsäure zeigte sich eine höhere Sekretionssteigerung von TNF- α in der Gruppe der AD-Patienten (Mittelwert AD-Patienten: 10,8fach) gegenüber der Gruppe der Kontrollprobanden (Mittelwert: 6,9fach). Der Unterschied erreichte keine statistische Signifikanz ($P=0,513$) (Abbildung 20).

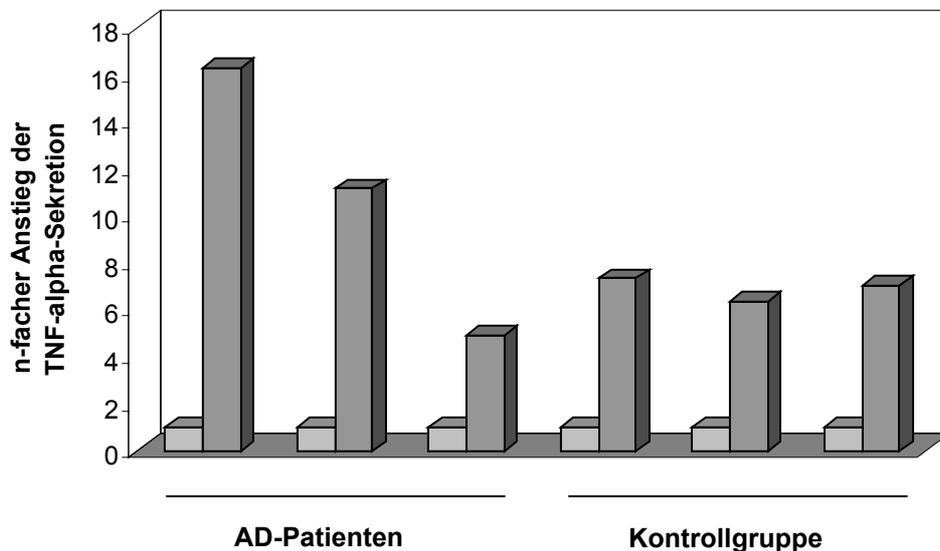


Abbildung 20: Induktion von TNF- α in Monozyten nach Stimulation mit Lipoteichonsäure

Nach vierstündiger Stimulation mit 10 ng/ml Lipoteichonsäure oder Medium als Basalwert wurde aus dem Überstand von je 3×10^4 Monozyten die sezernierte TNF- α -Konzentration mittels eines ELISAs bestimmt. Der jeweilige Basalwert (hellgrau) wurde gleich 1 gesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) und 3 Kontrollprobanden (KO).

4.5.5 Korrelation des Schweregrads der atopischen Dermatitis und der TLR2-Expression

Um zu prüfen, ob eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der atopischen Dermatitis und der TLR2-Expression besteht, wurden die Daten diesbezüglich untersucht. Eine Korrelation konnte jedoch nicht festgestellt werden ($r = 0,223$).

4.5.6 Korrelation des Alters und der TLR2-Expression

Da das Alter eine wichtige Einflussgröße auf die TLR-Expression darstellt, wurden die vorliegenden Daten auf eine mögliche Korrelation zwischen dem Alter der Probanden und der TLR2-Expression untersucht. Eine Korrelation konnte in dem hier untersuchten Kollektiv jedoch nicht festgestellt werden ($r = - 0,129$).

4.6 Toll-like Rezeptor 4

4.6.1 Expression von TLR4 (mRNA) in PBMC

Während es Unterschiede in der TLR2-Expression zwischen den AD-Patienten und der hautgesunden Kontrollgruppe gab, konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression des TLR4 in Gesamt-PBMC festgestellt werden. Der relative Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen ($= 1,1$) wurde entsprechend der $\Delta\text{-}\Delta\text{-}C_t$ -Methode berechnet (vgl. Abschnitt 3.2.12). Normalisiert wurde auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin (Delta C_t : TLR4 - $\beta_2\text{M}$ = 10,73 vs. 10,88; $P = n.s.$) (Abbildung 21).

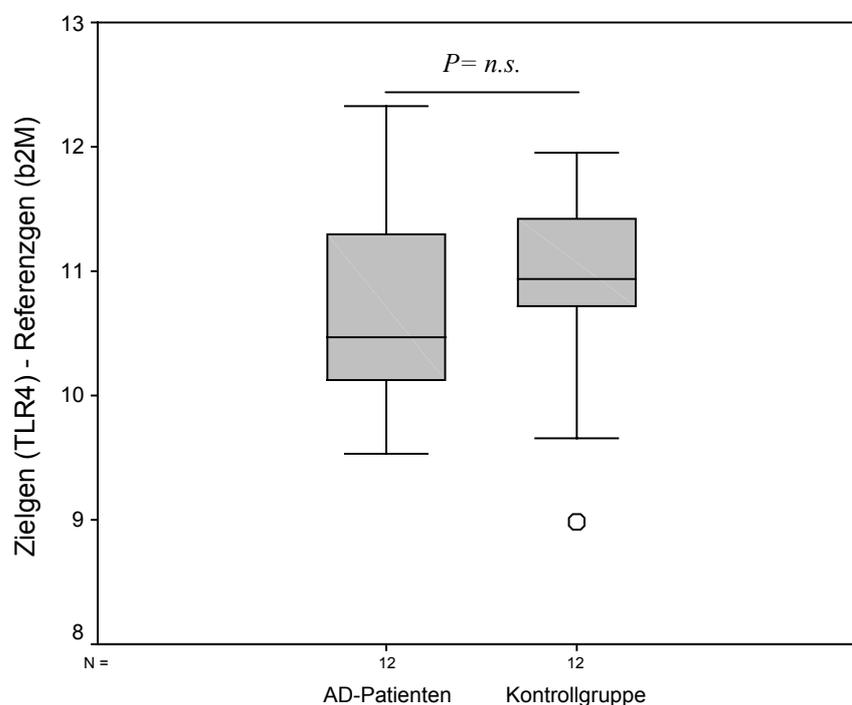


Abbildung 21: Expression von TLR4 in peripheren mononukleären Zellen des Bluts (PBMC)

Dargestellt sind die Ergebnisse der *real-time* PCR zur Untersuchung der TLR4-Expression in PBMC bei jeweils 12 Probanden pro Gruppe. PBMC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus heparinisiertem Vollblut gewonnen. Die Normalisierung erfolgte auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin ($\Delta\text{-}C_t$; Zielgen-Referenzgen). *N*: Anzahl.

4.6.2 Expression von TLR4 (mRNA) in peripheren Monozyten des Bluts

Um zu prüfen, ob zwischen beiden Probandengruppen Unterschiede in der monozytären TLR4-Expression nachzuweisen sind, wurde die Expression mittels *real-time* PCR untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der TLR4-Expression zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Normalisiert wurde auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin (ΔC_t : TLR4 - β_2M = 10,57 vs. 11,29; $P = n.s.$) (Abbildung 22).

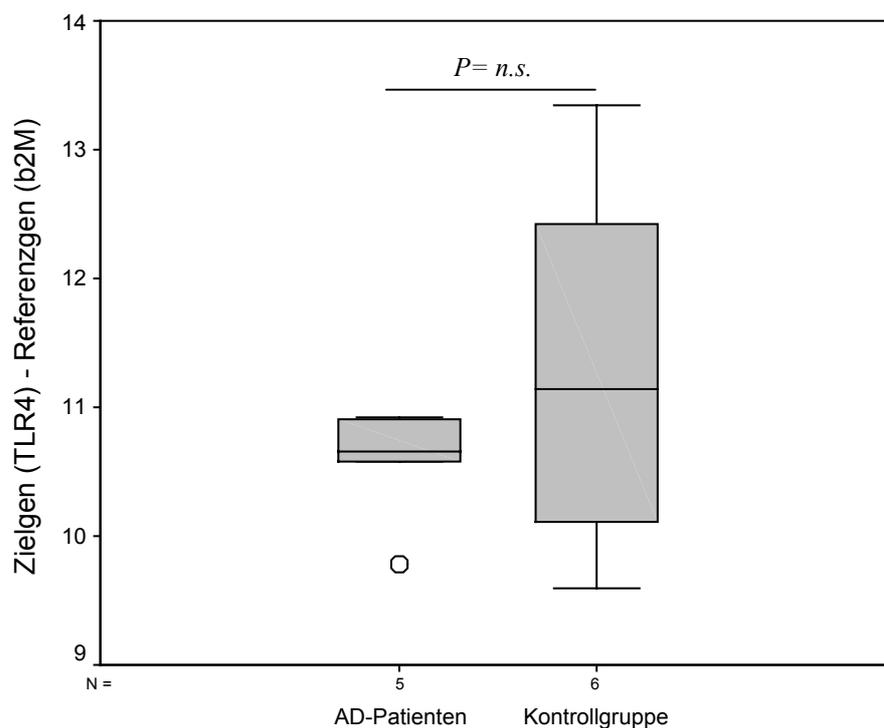


Abbildung 22: Expression von TLR4 in Monozyten

Mittels *real-time* PCR wurde die TLR4-Expression in peripheren Monozyten des Blutes untersucht. Die Monozyten wurden mit Hilfe von CD14 *MicroBeads* (Miltenyi) aus Gesamt-PBMC separiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von 5 (AD-Patienten) beziehungsweise 6 (Kontrollgruppe) Probanden pro Gruppe. Normalisiert wurde auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin (ΔC_t : Zielgen-Referenzgen). o: Ausreißer außerhalb der inneren Eingrenzung.

4.6.3 Oberflächenexpression von TLR4 auf CD14⁺ Monozyten

Entsprechend dem unter 3.2.4 beschriebenen Protokoll wurde die Oberflächenexpression des *Toll-like* Rezeptors 4 mittels Durchflusszytometrie auf CD14⁺ Monozyten des peripheren Bluts analysiert. Es konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den AD-Patienten und der Kontrollgruppe (n= je 6) festgestellt werden (Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI): 33,5 vs. 30,0; $P=0,394$), was mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene übereinstimmte. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der *FACS*-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von TLR4 auf CD14⁺ Monozyten dargestellt.

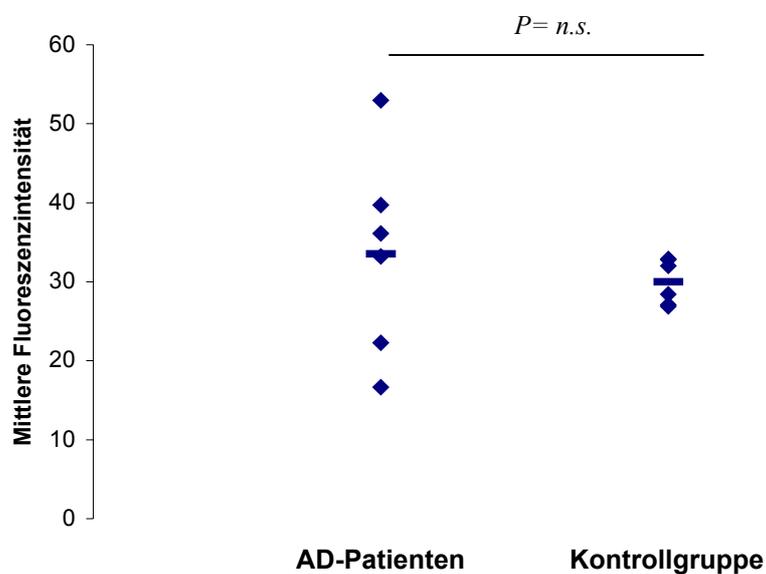


Abbildung 23: Oberflächenexpression von TLR4 auf CD14⁺ Monozyten

Dargestellt sind die Ergebnisse von 6 Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) und 6 Kontrollprobanden. Die Analyse der Oberflächenexpression erfolgte direkt, ohne weitere Stimulation der Zellen, mittels Durchflusszytometrie. AD, Patienten mit atopischer Dermatitis; -: Mittelwert.

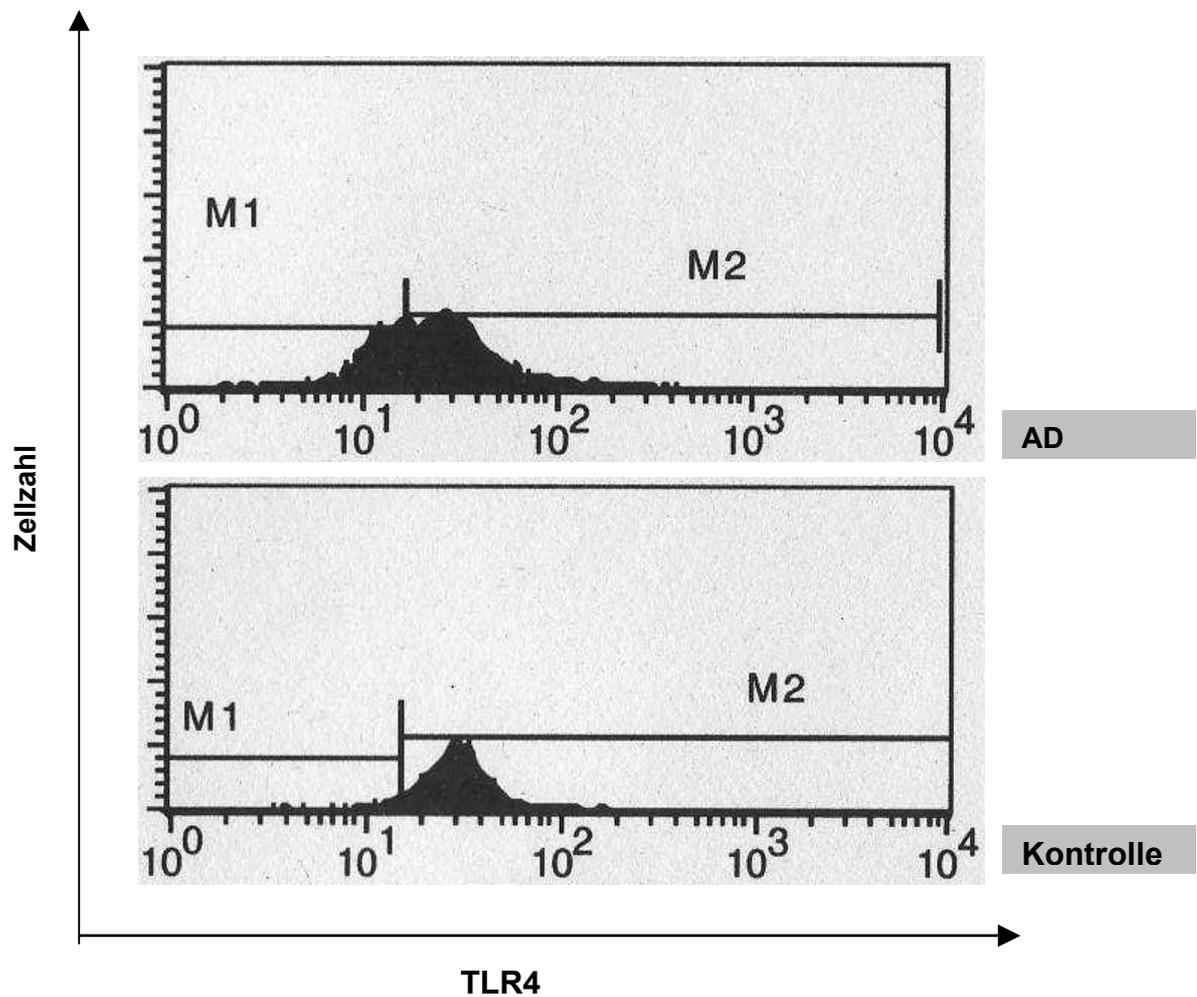


Abbildung 24: Oberflächenexpression von TLR4 auf CD14⁺ Monozyten

Dargestellt sind in Histogrammform jeweils die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der TLR4-Oberflächenexpression auf CD14⁺ Monozyten. Abgebildet ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der TLR4⁺CD14⁺positiven Zellpopulation (Population unter dem Marker M2). Das unspezifische Hintergrundsignal (Marker M1) sowie Fluoreszenzsignale toter Zellen sind aus der Analyse ausgeschlossen. X-Achse: TLR4-FITC; Y-Achse: Zellzahl. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs von jeweils sechs pro Gruppe (AD-Patienten/Kontrollprobanden: n= je 6). AD: Patienten mit atopischer Dermatitis.

4.7 Toll-like Rezeptor 9

4.7.1 Expression von TLR9 (mRNA) in PBMC

Neben den *Toll-like* Rezeptoren 2 und -4 wurde in dieser Arbeit die Expression des *Toll-like* Rezeptors 9 untersucht. Ein Vergleich der TLR9-Expression zwischen den AD-Patienten und der Kontrollgruppe ergab keinen signifikanten Unterschied in Gesamt-PBMC (Abbildung 25).

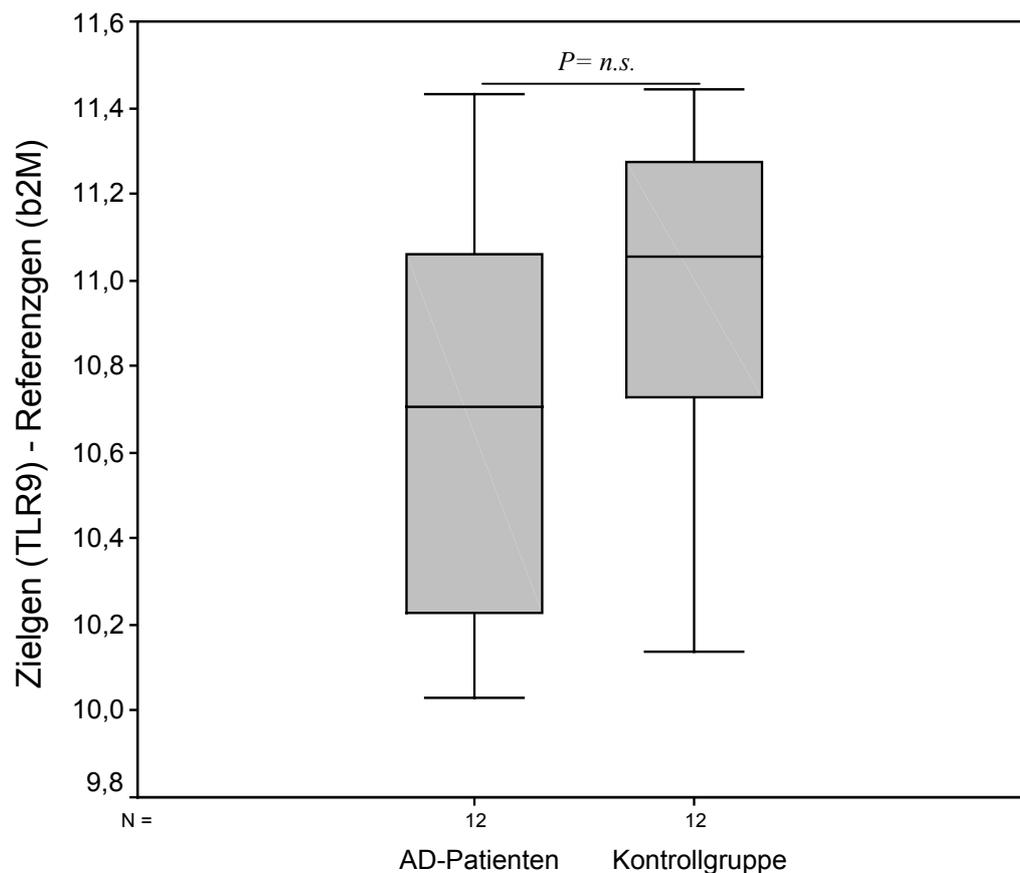


Abbildung 25: Expression von TLR9 in mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC)

Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils 12 Probanden pro Gruppe. PBMC wurden aus heparinisiertem Vollblut isoliert und ohne weitere Stimulation oder Kultur der Zellen wurde die Expression des TLR9 mittels *real time* PCR untersucht. Die Normalisierung erfolgte auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin (Δ -C_t; Zielgen-Referenzgen).

4.7.2 Expression von TLR9 in B-Lymphozyten und Monozyten

Im Vergleich der untersuchten Subpopulationen konnten deutliche Unterschiede in der TLR9-Expression (B-Lymphozyten > Monozyten, siehe Abbildungen 13, 13a und 13b) festgestellt werden. Zwischen den beiden Probandengruppen konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede in der relativen TLR9-Expression nachgewiesen werden. Es wurde relativ quantifiziert, das heißt, es wurden keine absoluten Kopienzahlen bestimmt, sondern die Expression des Zielgens (in diesem Fall TLR9) auf das Referenzgen (β_2M) bezogen und anschließend die beiden Probandengruppen miteinander ins Verhältnis gesetzt (Abschnitt 3.2.12). In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der *real-time* PCR für TLR9 in B-Lymphozyten für die Gruppe der AD-Patienten und der Kontrollgruppe dargestellt (Delta C_t : TLR9 - β_2M = 6,79 vs. 7,18; $P = n.s.$). In Abbildung 27 sind die entsprechenden Ergebnisse für Monozyten (Delta C_t : TLR9 - β_2M = 12,23 vs. 13,38; $P = n.s.$) dargestellt.

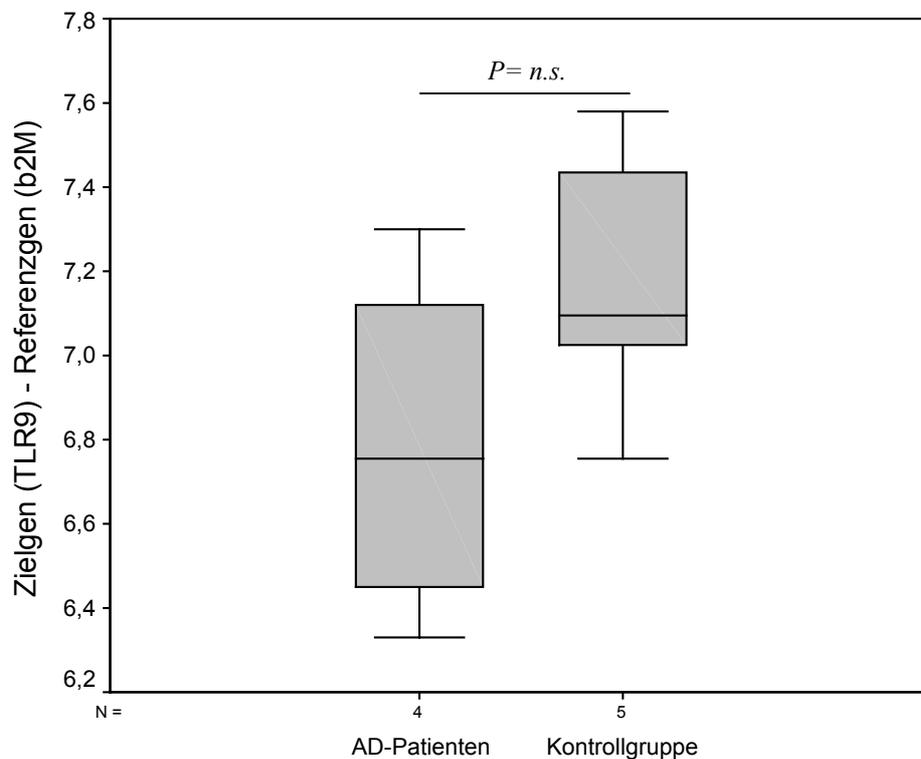
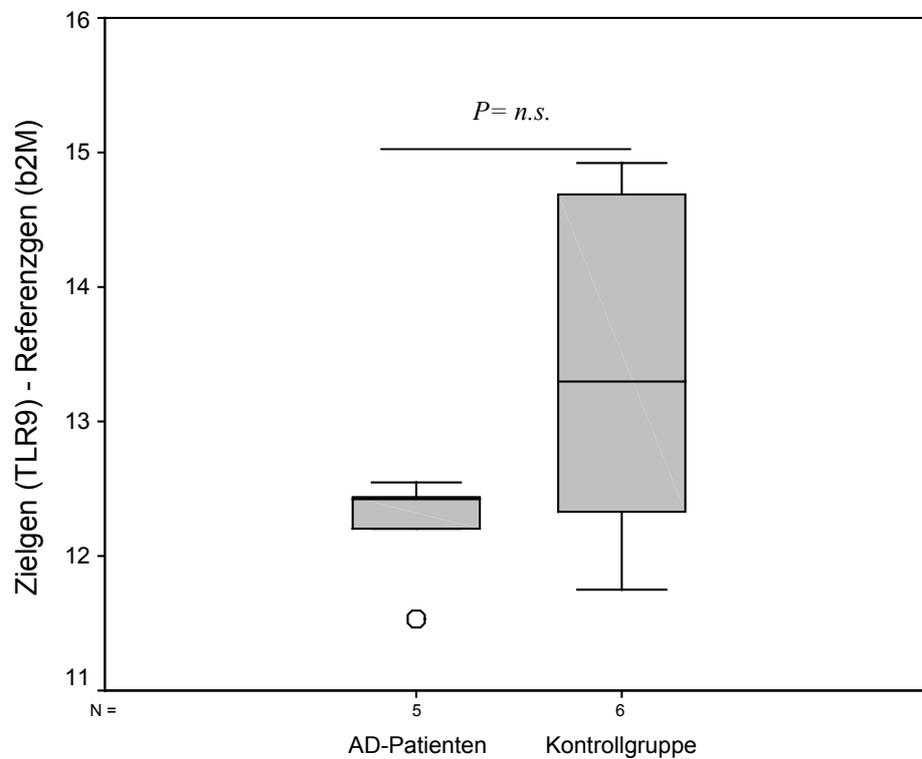


Abbildung 26: Expression von TLR9 in B-Lymphozyten

Dargestellt sind die mittels *real-time* PCR gemessenen Ergebnisse von 4 (AD-Patienten, AD) beziehungsweise 5 (Kontrollgruppe) Probanden. Zur Analyse der Subpopulation wurden B-Lymphozyten mit Hilfe von CD 19 *MicroBeads* (Miltenyi) aus PBMC separiert. Die Normalisierung erfolgte auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin (ΔC_t : Zielgen-Referenzgen).

**Abbildung 27: Expression von TLR9 in Monozyten**

Dargestellt sind die Ergebnisse der *real time* PCR aus den Proben von 5 Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) und 6 Probanden der Kontrollgruppe (KO). Die Monozyten wurden mit CD14 *MicroBeads* (Miltenyi) aus zuvor isolierten PBMC separiert. Die Normalisierung erfolgte auf das Referenzgen β_2 -Mikroglobulin (Δ -C_t; Zielgen-Referenzgen).