

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EXPRESSION VON TOLL-LIKE REZEPTOREN BEI  
ENTZÜNDLICHEN DERMATOLESEN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**CONRAD CLAUDIUS BLOBEL**  
aus Hamburg

Kiel 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Fölster-Holst

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kabelitz

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.05.2012

gez.: Prof. Dr. Gläser  
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Angeborene und erworbene Immunität .....	1
1.2	Toll-like Rezeptoren .....	2
1.3	TLR bei atopischem Ekzem .....	4
1.4	TLR bei Psoriasis .....	6
1.5	TLR bei Kontaktekzem .....	7
1.6	Fragestellung .....	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
2.1	Beschreibung der Patienten und Probanden .....	9
2.2	Chemikalien .....	11
2.2.1	Immunhistologische Färbungen .....	11
2.2.2	Antikörper .....	11
2.2.3	RNA-Isolierung .....	12
2.2.4	PCR .....	12
2.2.5	Gelelektrophorese .....	12
2.2.6	Puffer und Lösungen .....	12
2.3	Histologische Methoden .....	13
2.3.1	Einbetten der Probenentnahmen .....	13
2.3.2	Entparaffinierung und Rehydrierung .....	13
2.3.3	Immunhistologische DAB-Färbung an Paraffinschnitten .....	13
2.3.4	Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten .....	15
2.4	Zelllinien .....	16
2.5	RNA-Isolierung .....	16
2.5.1	RNA-Isolierung mit NucleoSpin®RNA-II-Kit .....	16
2.5.2	RNA Isolierung mittels Trizol® .....	17
2.6	RNA-Quantifizierung und Qualitätskontrolle .....	17
2.7	Desoxribonuklease-Verdau .....	18
2.8	Reverse Transkription .....	18
2.9	Realtime-PCR .....	18
2.10	Gelelektrophorese .....	20
2.11	Statistische Auswertung .....	20

2.12	Mikroskopische Untersuchung und fotografische Dokumentation.....	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
3.1	TLR2- und TLR4-mRNA wird konstitutiv in humanen Keratinozyten exprimiert .....	22
3.2	Immunhistologische DAB-Färbung an Paraffinschnitten von gesunder und erkrankter Haut .....	24
3.2.1	TLR2-Expressionsmuster bei Normalhäuten .....	24
3.2.2	TLR2-Expressionsmuster bei atopischem Ekzem.....	25
3.2.3	TLR2-Expressionsmuster bei Psoriasis.....	26
3.2.4	TLR2-Expressionsmuster bei Kontaktekzem.....	27
3.2.5	TLR4-Expressionsmuster in Normalhäuten .....	28
3.2.6	TLR4-Expressionsmuster bei atopischem Ekzem.....	29
3.2.7	TLR4-Expressionsmuster bei Psoriasis.....	30
3.2.8	TLR4-Expressionsmuster bei Kontaktekzemen.....	31
3.3	Subzelluläres Expressionsmuster von TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten von gesunder und erkrankter Haut .....	32
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>35</b>
4.1	Konstitutive Expression von TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten auf mRNA- und Proteinebene .....	35
4.2	Intraepidermale Lokalisation von TLR2 und TLR4.....	37
4.2.1	TLR2 .....	37
4.2.2	TLR4 .....	40
4.3	TLR2 und TLR4 werden intrazellulär exprimiert .....	41
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>57</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre-Desoxiribonukleinsäure
DAB	Diaminobenzidin-dihydrochlorid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HaCaT	human adult low calcium high temperature keratinocytes
HBD	humane Beta-Defensine
HLA	humanes Leukozyten Antigen
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRS	immunreaktiver Score
kDa	Kilo-Dalton
LL-37	Cathelecidin
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	confocal laser-scanning microscope
MDB	membrane desalting buffer
ml	Milliliter
mmol	Millimol

## Abkürzungsverzeichnis

---

mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRR	pattern recognition receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
S100A7	Psoriasin
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	tris buffered saline
TBS-T	tris buffered saline plus tween
TH	T-Helfer
THP-1	human acute monocytic leukemia cell line
TIRAP	Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor protein
TIR-Domäne	Toll-Interleukin-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
$\mu$ g	Mikrogramm

# 1 Einleitung

## 1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Die Haut stellt die äußerste Barriere des Körpers in der Verteidigung gegen pathogene Eindringlinge dar. Diese Funktion wird durch eine physikalische und eine immunologische Barriere erfüllt. Die physikalische Barriere der Haut grenzt das innere Milieu des Körpers zur Umgebung ab. Sie dient dem Schutz vor Umwelteinflüssen, verhindert ein Eindringen von Mikroorganismen und schützt vor epidermale Wasserverlust (Proksch et al. 2011). Komplexe Differenzierungsprozesse von Keratinozyten, welche zur Bildung von Proteinen und Lipiden führen, sind maßgebend an der Aufrechterhaltung dieser Funktionen beteiligt (Proksch et al. 2009).

Die immunologische Barriere wird in eine angeborene und in eine erworbene Immunität unterteilt. Die angeborene Immunität ist entscheidend an der unmittelbaren Abwehr von Mikroorganismen nach deren Invasion in die Epidermis, insbesondere unter den Bedingungen einer gestörten Barrierefunktion der Haut, beteiligt. Diese Form der Immunabwehr besitzt unter Anderem die Eigenschaft, häufig vorkommende Struktur motive, die sogenannten pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), von Pathogenen zu detektieren (Medzhitov und Janeway 2000), um diese nach Erkennung innerhalb von Minuten durch die spezifischen Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität zu bekämpfen (Akira und Hemmi 2003). Die Rezeptoren auf immunologischen Zellen, die diese PAMPs erkennen, werden als pattern recognition receptors (PRRs) bezeichnet (Medzhitov 2001). Hierzu zählen die Toll-like Rezeptoren (TLR), von denen jeder die Eigenschaft besitzt, unterschiedliche PAMPs zu erkennen. Aufgabe der erworbenen Immunität hingegen ist die gezielte Antigenerkennung, die Antikörperproduktion, die Spezifitätserhöhung auf bestimmte Antigene, sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses mithilfe von antigenspezifischen Gedächtniszellen. Hierbei handelt es sich um spezifische T- und B-Lymphozyten, auf deren Zelloberfläche sich eine Vielzahl von antigenspezifischen Rezeptoren befindet. Mittels DNA-Rekombination wird ein großes Rezeptorspektrum ausgebildet, welches der Erkennung verschiedener Antigene dient und einer erneuten Besiedelung mit demselben Pathogen adäquat entgegenwirkt.

## 1.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind ein wichtiger Teil der angeborenen Immunität und werden von nahezu jedem Gewebe des menschlichen Körpers exprimiert. Die Gewebe mit der höchsten Expressionsrate sind zur Umwelt exponierte Areale wie Atemwege, Gastrointestinaltrakt und Haut (Zarembek und Godowski 2002). Sie werden auf Keratinozyten, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen aber auch auf Langerhans-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert (Miller und Modlin 2007). Da sie zu den PRRs gehören und somit entscheidend an der Erkennung der PAMPs beteiligt sind, kommt ihnen insbesondere bei den oben genannten in der Haut vorkommenden Zellen eine wichtige Rolle in der Früherkennung mikrobieller Strukturmodule zu. Angesichts der vielfältigen Funktionen der angeborenen Immunität können Dysfunktionen in einer ihrer Komponenten zur Entstehung entzündlicher oder infektiöser Prozesse beitragen. Somit ist es nicht verwunderlich, dass eine mangelhafte oder fehlgeleitete TLR-Aktivierung mit verschiedenen Infektionskrankheiten der Haut assoziiert wird (Picard et al. 2003; Bochud et al. 2003; Kang et al. 2002). Es wird vermutet, dass eine fehlerhafte oder falsch regulierte Antwort der TLR auf bestimmte Liganden zu einer Chronifizierung und dauerhaften Verschlechterung im Schweregrad der Erkrankung führen kann.

Gerade vor diesem Hintergrund ist der Vergleich von gesunder und entzündlicher Haut sowie von unterschiedlichen Dermatosen interessant. Daten, welche einen direkten Vergleich der TLR bei den von uns untersuchten Krankheiten ermöglichen, waren zu Beginn dieser Arbeit nicht vorhanden. Toll-like Rezeptoren sind aus einer extrazellulären und einer zytoplasmatischen Domäne aufgebaut. Die extrazelluläre Domäne, welche für die Erkennung der PAMPs verantwortlich ist, wird durch leuzinreiche Wiederholungen charakterisiert. Die zytoplasmatische Domäne wird aufgrund ihrer Homologie zum IL-1-Rezeptor als TIR- (Toll/IL-1-Rezeptor) - Domäne bezeichnet und zählt zu den Typ1-Transmembran-Proteinen. Eine kurze Transmembrandomäne verbindet die extrazelluläre mit der zytoplasmatischen Domäne, welche für die Signaltransduktion verantwortlich ist (Hallmann et al. 2001).

Die Stimulation der TLR führt zum Ablauf einer Signalkaskade, welche die Aktivierung des Adapterproteins MyD88 sowie des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B mit einschließt (Akira et al. 2003). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt zu einer gesteigerten Expression verschiedener, an Entzündungsreaktionen beteiligten Mediatoren und gilt als kritischer Punkt für die Entstehung



von entzündlichen Prozessen (Iwasaki und Medzhitov 2004; Kawai et al. 2007). Jeder, der 10 beim Menschen identifizierten TLR ist für die Erkennung unterschiedlicher PAMPs wie Peptidoglycan (PGN), Lipopolysaccharid (LPS), Lipoteichonsäure (LTA) und bakterieller DNA-Struktur motive, zuständig. Wie bereits erwähnt werden TLRs in verschiedenen Zelltypen exprimiert, sodass sich bei humanen Keratinozyten eine konstitutive Expression von TLR1, 2, 3, 5 und 9 (Mempel et al. 2006) sowie 6 und 10 (Lebre et al. 2006) nachweisen lässt. Unterschiedliche Daten gibt es in Bezug auf TLR4. Während einige Autoren keinen TLR4 in humanen Keratinozyten nachweisen konnten (Mempel et al. 2006, Köllisch et al. 2005) ist dies anderen gelungen (Lebre et al. 2006; Begon et al. 2007; Pivarcsi et al. 2003; Song et al. 2002).

Bezüglich des subzellulären Musters bestehen offensichtlich unterschiedliche Meinungen. Die meisten TLRs, inklusive TLR2 und 4 werden als membranständig beschrieben (Curry et al. 2003; Mogensen et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um Begon et al. weist hingegen eine zytoplasmatische Lokalisation von TLR2 und 4 auf. Eine Stimulation von TLR2 auf Keratinozyten mit Peptidoglycan oder Lipoteichonsäure, führt zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und unter Anderem zu einer Ausschüttung des Entzündungsmediators IL-8, welcher chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt (Pivarcsi et al. 2003). Eine Stimulation von TLR3, 4, 5 und 9 durch Lipopolysaccharid, Flagellin oder CpG-Motiven ist mit einer Sekretion von IL-8 und TNF $\alpha$  verbunden (Lebre et al. 2006). Eine Induktion der humanen  $\beta$ -Defensine 2 und 3 (HBD-2 und HBD-3) sowie der RNase7, welche zu der Gruppe der antimikrobiellen Peptide zählen, lassen sich durch eine Aktivierung von TLR2 beziehungsweise von TLR2/TLR6 auslösen (Wanke et al. 2010). Folglich kommt es nach Stimulation von TLR zu einer Aktivierung von Entzündungsmediatoren und antimikrobiellen Peptiden.

Ein weiteres Charakteristikum des TLR-Signalweges ist die Überführung der erworbenen Immunität in eine TH-dominierte Antwort (Su et al. 2005) und es gibt deutliche Hinweise darauf, dass eine fehlerhafte TLR-Signaltransduktion entscheidend an der Entstehung entzündlicher Krankheiten beteiligt ist (Turvey und Hawn 2006). Insbesondere bei chronisch-entzündlichen Hautkrankheiten wie dem atopischen Ekzem, dem Kontaktekzem und der Psoriasis kommt es zu einer Störung der Barrierefunktion, welche mit einer Störung der immunologischen Barriere einhergehen kann.

Proksch et al. gelang es nachzuweisen, dass es nach Störung der Hautbarriere zu einer Induktion der DNA-Synthese und der Lipidproduktion (Proksch et al. 1993) sowie zu einer fehlerhaften Immunantwort (Lee et al. 2006; Denda et al. 2009) kommt. Vor diesem Hintergrund ist es zwar bekannt, aber dennoch erstaunlich, dass Patienten mit atopischem Ekzem deutlich häufiger von bakteriellen Infektionen betroffen sind als dies bei Patienten mit Psoriasis der Fall ist (Christophers und Henseler 1987; McGirt und Beck 2006; Roll et al. 2004).

### **1.3 TLR bei atopischem Ekzem**

Das atopische Ekzem ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung und stellt eines der häufigsten dermatologischen Krankheitsbilder dar. In Deutschland wird es mit einer Prävalenz von 10-12% bei Vorschulkindern sowie 3% bei Erwachsenen angegeben (Fölster-Holst et al. 2011). Gemeinsam mit der allergischen Rhinokonjunktivitis und dem allergischen Asthma gehört das atopische Ekzem zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Coca und Cooke prägten 1923 den Begriff Atopie, indem sie ihn als eine Überempfindlichkeitsreaktion von Haut und Schleimhäuten gegenüber Umweltstoffen beschrieben (Coca und Cooke 1923).

Betroffene weisen in Abhängigkeit des Alters unterschiedliche Prädilektionstellen auf, welche durch ein pruriginöses Ekzem charakterisiert sind. Während das atopische Ekzem des Kleinkindes morphologische Merkmale in Form von Beugenekzemen der Extremitäten und Lichenifikation aufweist, treten im Erwachsenenalter häufig die Prurigo sowie das dyshydrosiforme Hand- und Fußekzem zusätzlich klinisch in Erscheinung (Fölster-Holst et al. 2011). Bei 80-90% der Patienten mit atopischem Ekzem lassen sich erhöhte IgE-Serumspiegel sowie spezifische IgE-Antikörper nachweisen. In Verbindung mit anderen, oben genannten Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis wird auch vom „extrinsischen atopischen Ekzem“, der schweren Verlaufsform des atopischen Ekzems, gesprochen (Schmid-Grendelmeier et al. 2001).

Die klinisch mildere Form, das intrinsische atopische Ekzem, ist durch niedrigere IgE-Serumspiegel beziehungsweise durch gänzlich fehlende spezifische IgE-Serumspiegel gekennzeichnet (Fölster-Holst et al. 2006). Es ist hinreichend bekannt, dass Patienten mit atopischem Ekzem sowie anderen Krankheiten aus dem atopischen Formenkreis häufig eine

positive Familienanamnese aufweisen. Fölster-Holst et al. zeigte, dass den Genloci 11q13 und 5q31.1 eine besondere Rolle in der Pathogenese des atopischen Ekzems zukommt (Fölster-Holst et al. 1998). Wie andere allergische Erkrankungen ist auch das atopische Ekzem in der Akutphase durch eine TH-2 Immunantwort der Haut gekennzeichnet (Hamid et al. 1994).

Die auftretenden Hautveränderungen sind sehr anfällig für bakterielle und virale Superinfektionen (Leung 2003). Bei bis zu 90 % der betroffenen Patienten zeigt sich eine Superinfektion der Hautläsionen mit dem gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus*, wohingegen bei nur 5-30% der gesunden Bevölkerung eine Besiedelung zu beobachten ist (Leung und Bieber 2003). Antimikrobielle Peptide wie HBD-2, HBD-3 sowie LL-37 (Cathelicidin) werden im Vergleich zu psoriatischen Hautveränderungen verringert exprimiert (Nomura et al. 2003, Ong et al. 2002; Rieg et al. 2005). Es wird aus diesem Grunde spekuliert, ob ein Defizit in der Expression bestimmter Gene der angeborenen Immunität ein Grund für die starke Neigung zu bakteriellen Superinfektion mit *Staphylococcus aureus* bei atopischem Ekzem sein könnte.

Interessanterweise werden *E.coli* Infektionen bei atopischem Ekzem jedoch kaum beobachtet. Der Arbeitsgruppe um Gläser et al. gelang es nachzuweisen, dass die bei atopischem Ekzem erhöht festgestellte Expression des antimikrobiellen Peptids Psoriasin (S100A7) hierfür verantwortlich ist (Gläser et al. 2009). Jüngste Studien haben bei Patienten mit atopischem Ekzem Polymorphismen in den Genen verschiedener TLRs beziehungsweise den Signalmolekülen identifiziert. Eine Studie konnte bei Patienten mit besonders schwerer Form des atopischen Ekzems und extrem hoher Besiedelung mit *Staphylococcus aureus* einen Polymorphismus im TLR2 (R753Q) nachweisen (Ahmad-Nejad et al. 2004).

Im Widerspruch dazu steht die Publikation von Weidinger et al., welche keinen Zusammenhang zwischen dem atopischen Ekzem und dem oben beschriebenen Polymorphismus herstellen konnte (Weidinger et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um Niebuhr et al. stellte bei Makrophagen von Patienten mit atopischem Ekzem im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine signifikant erniedrigte TLR2 Expression und TLR2 vermittelte Zytokinproduktion fest (Niebuhr et al. 2009). Die verringerte, durch TLR2 vermittelte Zytokinproduktion könnte folglich die vermehrte Hautkolonisation mit *Staphylococcus aureus* begünstigen.

## 1.4 TLR bei Psoriasis

Die Psoriasis ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung, deren klassische Morphologie durch scharf begrenzte, erythematöse Plaques gekennzeichnet ist und eines der häufigsten dermatologischen Krankheitsbilder darstellt. Die Prävalenz der Psoriasis wird in den westlichen Industrieländern mit ca. 2-3 % angegeben. In Deutschland sind circa zwei Millionen Menschen betroffen (Mrowietz und Reich 2009) und es bestehen keine Unterschiede in der Prävalenz zwischen Männern und Frauen (Farber und Nall 1974).

Die Krankheit kann in jedem Alter ausbrechen, wobei sich zwei Altersgipfel feststellen lassen. Der Altersgipfel, der schubartig und häufig schwer verlaufenden Typ-1-Psoriasis, von der ca. 70 % betroffen sind, liegt zwischen 20 und 29 Jahren, zeigt eine familiäre Prädisposition und ist mit verschiedenen humanen Leukozyten Antigenen, v.a. HLA-Cw6 Eigenschaften assoziiert. Die Patienten mit Typ-2-Psoriasis sind bei Erstmanifestation in der Regel zwischen 50 und 59 Jahren und zeigen weder eine familiäre Prädisposition noch eine HLA-Assoziation (Henseler und Christophers 1985).

Die Psoriasis vulgaris, die häufigste Form der Erkrankung, ist durch scharf begrenzte, erythematöse Plaques mit festhaftender Schuppung charakterisiert. Neben der klassischen Form lassen sich anhand von Klinik und Pathogenese weitere Formen wie die arthropathische oder die pustulöse Psoriasis abgrenzen. Typische Prädilektionsstellen sind Streckseiten der Extremitäten, behaarter Kopf sowie die Anogenitalregion. Im Gegensatz zum atopischen Ekzem, welches zumindest in der Frühphase TH-2 vermittelt ist, ist die Psoriasis mit einer TH-1 vermittelten Immunreaktion assoziiert (Kupper und Fuhlbrigge 2004).

Im Vergleich zum atopischen Ekzem ist festzustellen, dass es bei der Psoriasis kaum zu einer Superinfektion mit *Staphylococcus aureus* kommt (Henseler und Christophers, 1995). Ein Grund hierfür könnte der von der Arbeitsgruppe um Harder et al. nachgewiesene hohe Gehalt an antimikrobiellen Peptiden in psoriatischen Läsionen sein (Harder und Schröder 2005). Zudem könnte die in Keratinozyten von Psoriasis Patienten nachgewiesene Überexpression von TLR2 im Vergleich zu gesunder Normalhaut ursächlich sein (Begon et al. 2007).

Es liegt soweit der Verdacht nahe, dass antimikrobielle Peptide auf eine gesteigerte TLR-Expression reagieren und somit eine bakterielle Superinfektion verhindern. Die Arbeitsgruppe um Miller et al. konnte zeigen, dass der Transforming Growth Factor (TGF)- $\alpha$  sowohl in Wunden als auch in psoriatischen Läsionen erhöht ist. Dieser Keratinozytenwachstumsfaktor

steigert die Expression von TLR 5 und 9 sowie die TLR abhängige Zytokinproduktion und erhöht beta-Defensine (Miller et al. 2005).

## **1.5 TLR bei Kontaktekzem**

Das Kontaktekzem, welches durch eine TH-1-Reaktion charakterisiert ist (Kupper und Fuhlbrigge 2004), wird prinzipiell in zwei Hauptformen unterteilt: das allergische und das toxische Kontaktekzem. Beim allergischen Kontaktekzem handelt es sich um eine spezifische, zellvermittelte Immunreaktion, die eine vorangegangene Sensibilisierung gegenüber einem Allergen voraussetzt (Kimber et al. 2002).

Die hohe Spezifität gegenüber einem bestimmten Allergen ist kennzeichnend für einen allergischen Prozess und es handelt sich hierbei um eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV nach Coombs und Gell (Kimber et al. 2002). Klinisch tritt das allergische Kontaktekzem häufig als unscharfes, zur Streuung neigendes pruriginöses Ekzem mit oder ohne Krustenbildung in Erscheinung. Sensibilisierungen gegenüber Nickel, Cobalt, Gummibestandteilen, Haarwaschmitteln und Duftstoffen zählen in den Industrieländern zu den häufigsten Gründen für das allergische Kontaktekzem (Andersen 2003). Das toxische Kontaktekzem ist eine durch direkten Kontakt mit einer starken Noxe ausgelöste und fakultativ ablaufende Entzündungsreaktion. Es tritt obligat auf und verläuft ohne Produktion spezifischer Antikörper. Anhand von Klinik, Anamnese sowie pathogenetischen Faktoren wird das akut-toxische vom chronisch-toxischem Kontaktekzem unterschieden. Das akut-toxische Kontaktekzem ist zumeist das Resultat eines direkten Hautkontakts mit einer stark toxischen Substanz (Chew und Maibach 2003). Das chronisch-toxische Kontaktekzem wird durch chronischen Hautkontakt mit einer Noxe ausgelöst. Anders als beim akut-toxischem Kontaktekzem kommt es zu einer stufenweise Abnahme der Hautbarrierefunktion und es resultieren ekzematöse Hautreaktionen (English et al. 2004).

Im Vergleich zum akut-toxischen handelt es sich beim chronischen Kontaktekzem meist um weniger starke Noxen wie Seifen, organische Lösungen oder mechanische Belastungen wie Druck und Scherkräfte (Slodownik und Nixon 2007). Neuste Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem durch Nickel ausgelösten allergischen Kontaktekzem und dem

TLR4 herstellen. Schmidt et al. gelang es erstmals nachzuweisen, dass TLR4, welcher normalerweise an der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen wie Lipopolysacchariden beteiligt ist, auch durch Nickel stimuliert wird. Eine direkte Stimulation des TLR4 mit Nickel führte zu einer Stimulation der Signalkaskade mit nachfolgender Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Die Zieldomäne zur Detektion und die nachfolgend ablaufende Entzündungsreaktion unterscheidet sich jedoch von derer, welche für die Bindung von Lipopolysacchariden verantwortlich ist.

Hiermit wurde Nickel als erstes anorganisches Kontaktallergen identifiziert, welches die Eigenschaften besitzt, das angeborene Immunsystem über TLR4 direkt aktivieren zu können (Schmidt et al. 2010). Es ist also in Zukunft denkbar, den TLR4 wie auch andere TLRs mit bestimmten Substanzen zu blocken und somit entscheidend in die Pathogenese des allergischen Kontaktekzems einzugreifen. Andere Studien haben bereits eine indirekte Aktivierung von TLR2 und TLR4 durch verschiedene anorganische Substanzen wie Fluorescein Isothiocyanat (FITC) festgestellt, die die Freisetzung bestimmter TLR Liganden stimulieren (Freudenberg et al. 2009; Martin et al. 2008).

## **1.6 Fragestellung**

In der vorliegenden Dissertation wird die Expression von TLR2 und TLR4 in entzündeter im Vergleich zu gesunder Haut untersucht. Darüber hinaus soll festgestellt werden, ob sich die Expression dieser Rezeptoren in bestimmten entzündlichen Dermatosen wie dem atopischen Ekzem, der Psoriasis und dem Kontaktekzem unterscheidet.

Im Detail sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Werden TLR2 und TLR4 konstitutiv in humanen Keratinozyten exprimiert? Wenn ja, in welchen Bereichen der Epidermis findet diese Expression statt?
2. Gibt es Unterschiede in der Expression und dem subzellulären Muster von TLR2 und TLR4 zwischen gesunder und entzündeter Haut?
3. Gibt es Unterschiede in der Expression und dem subzellulären Muster von atopischen Ekzemen, Psoriasis und Kontaktekzemen?

## **2 Material und Methoden**

Es handelt sich um eine retrospektive Studie, die anhand von Patientenakten und archivierten Paraffinblöcken der Patienten vorgenommen wurde. Die paraffinfixierten Präparate wurden im Zeitraum von 2004-2007 entnommen und unter gleichen Bedingungen konserviert und gelagert.

### **2.1 Beschreibung der Patienten und Probanden**

Da es in der Arbeit primär um die immunhistochemische Untersuchung geht, wurden zunächst die Paraffinblöcke von Patienten mit atopischem Ekzem, Psoriasis und Kontaktekzem herausgesucht. Die Charakterisierung der Patienten erfolgte anhand anamnestischer und klinischer Daten, die in den Patientenakten dokumentiert waren. Es handelte sich um 9 Patienten mit atopischem Ekzem im Alter von 40-67 Jahren (Durchschnittsalter: 49,7 Jahre) mit einer Geschlechterverteilung von 44 % weiblichen Patienten zu 56 % männlichen Patienten. Drei Patienten boten ein nummuläres Ekzem atopischer Genese und sechs Patienten ein klassisches Beugenekzem.

Bei den Psoriasis-Präparaten handelte es sich um 12 Patienten im Alter von 41-65 Jahren (Durchschnittsalter: 53,2 Jahre) mit einer Geschlechtsverteilung von 57 % weiblichen zu 43 % männlichen Patienten. Von den Psoriasis Patienten boten 10 eine Psoriasis vulgaris, und jeweils ein Patient eine Psoriasis pustulosa sowie eine Psoriasis palmoplantaris. Für die Untersuchung des Kontaktekzems wurden 12 Präparate beurteilt. Das Alter der Patienten variierte von 38-68 Jahren (Durchschnittsalter: 54 Jahre) und die Geschlechtsverteilung betrug 43 % weiblichen zu 57 % männlichen Probanden.

Die Proben gesunder Haut stammten aus plastisch-chirurgischen Operationen von insgesamt 5 Probanden im Alter von 37-62 Jahren (Durchschnittsalter: 47 Jahre) mit einer Geschlechtsverteilung von 60 % weiblichen zu 40 % männlichen Probanden.

Erkrankung	Alter der Patienten und Probanden	Lokalisation der Entnahmestelle und Anzahl (n)	Geschlechtsverteilung* und Anzahl (n)	Morphologie/ Einteilung		akut/ chronisch	
AE	40-67 Mittelwert: 49,7 Jahre	Rücken n=3 Arm n=3 Bein n=3	1=4 0=5 n=9	nummuläres Ekzem	n=3	akut: n=7 chron.:n=2	
				klassisches Beugeneckzem	n=6		
Pso	41-65 Mittelwert 53,2 Jahre	Rücken n=5 Arm n=4 Bein n=3	1=7 0=5 n=12	Psoriasis vulgaris	n=10	akut: n=9 chron.:n=3	
				Psoriasis pustulosa	n=1		
				Psoriasis palmaris	n=1		
KE	38-68 Mittelwert: 54 Jahre	Hals n=2 Rücken n=5 Arm n=3 Bein n=2	1=5 0=7 n=12	allergisch	Substanz:		akut.:n=10 chron.:n=2
					Gummi oder Kunstharze(4-4-Diaminotiphenylmethan	n=1	
					Duftstoffe und tert.Buthylhydrochinon	n=3	
					Nickel/Kobalt(II)-Chlorid	n=5	
					Kolophonium Sudanrot 3, Paraben-Mix	n=1	
					Desinfektionsmittel(Alcigor)	n=1	
					Cetylstearylalkohol	n=1	
					Gesamt	n=12	
				toxisch	n=0		
Normalhaut	37-62 Mittelwert 47 Jahre	Rücken n=3 Arm n=1 Bein n=1	1=3 0=2	Gesund			

**Tab. 1: Beschreibung der Patienten und Probanden**

1= weiblich; 0= männlich; AE= Atopisches Ekzem; Pso= Psoriasis; KE= Kontaktekzem



## 2.2 Chemikalien

### 2.2.1 Immunhistologische Färbungen

Antifade Gold	Invitrogen™, Karlsruhe
<i>Aqua destillata</i>	DeltaSelect, Dreieich
CY2	Jackson, Baltimore, USA
DAB	BioGenix, San Ramon, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Farbstoff Hoechst-33342	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehydlösung	Büsing & Fasch, Oldenburg
Glycergel Mounting Serum	DAKO Glostrup, Dänemark
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Walter, Kiel
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt
Paraffin®	Roth, Karlsruhe
Parafilm	American Nationalcan, Greenwich, USA
Paraplast® PLUS	Roth, Karlsruhe
StreptAB Complex HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
Sudanschwarz	Dr.Harms, Leverkusen
Tween	Roth, Karlsruhe
Xylol	Walter, Kiel

### 2.2.2 Antikörper

Toll-like Rezeptor 2 Antikörper (Rabbit polyclonal to TLR2)	Abcam, Cambridge, USA
Toll-like Rezeptor 4 Antikörper (Rabbit polyclonal to TLR4)	Abcam, Cambridge, USA
Swine-anti-Rabbit -Antikörper biotinyliert	DAKO, Glostrup, Dänemark
CY2 (Goat-anti-Rabbit)	Jackson, Baltimore, USA

### 2.2.3 RNA-Isolierung

NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Trizol <sup>®</sup>	Invitrogen <sup>™</sup> , Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	MERCK, Darmstadt
DNAse I	Promega, Madison, USA

### 2.2.4 PCR

<i>Aqua destillata</i>	DeltaSelect, Dreieich
PCR-Puffer	Invitrogen <sup>™</sup> , Karlsruhe
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Sybr TaKara Mix <sup>™</sup>	TaKara Bio Inc., Otsu, Japan
RT-Puffer	Invitrogen <sup>™</sup> , Karlsruhe
Oligodesoxythymidin-Lösung	Invitrogen <sup>™</sup> , Karlsruhe

### 2.2.5 Gelelektrophorese

Agarose	CambrexBioScience, USA
Bromphenolblau/Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ready-Load <sup>™</sup> 100 bp DNA Ladder	Invitrogen <sup>™</sup> , Karlsruhe

### 2.2.6 Puffer und Lösungen

Citratpuffer: Ansatz für 500ml Lösung: 9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B in 450 ml *Aqua dest.* gelöst.

Stammlösung A: 0,1M Zitronensäure in 1000 ml *Aqua dest.*

Stammlösung B: 0,1M Natriumcitrat in 1000 ml *Aqua dest.*

TBS: Stammlösung: pH 7,4; 56 g Tris (Merck, Darmstadt), 218,25g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt) ad. 2500 ml *Aqua dest.*, Gebrauchslösung: 1: 10 mit *Aqua dest.* verdünnen)

TBS-T:	siehe oben, plus 0,1 % Tween
TAE:	40 mM Tris-Acetat, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,4
PBS:	Stammlösung: 8,0 g Natriumchlorid; 0,2 g Kaliumchlorid; 1,44g Dinatriumhydrogenphosphat; 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat ad. 1000 ml <i>Aqua dest.</i> ,

Blockierserum: 0,1 % bovines Serumalbumin (BSA) und 0,2 % Glycin in TBS

## 2.3 Histologische Methoden

### 2.3.1 Einbetten der Probenentnahmen

Zur Vorbereitung der immunhistologischen Färbungen wurden die Hautpräparate in 4 % Paraformaldehyd über Nacht fixiert. Anschließend wurden diese mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und schließlich in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden auf -20 °C gekühlt und mithilfe eines Mikrotoms (Microm<sup>®</sup> International Cool Cut, Walldorf) in 4-6 µm Dicke geschnitten. Danach wurden sie auf einen beschichteten Objektträger (Superfrost<sup>®</sup> Plus, Menzel, Braunschweig) aufgezogen und bei 37 °C über Nacht getrocknet.

### 2.3.2 Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Schnitte wurden zum Entparaffinieren zunächst bei 64 °C für 40 Minuten in einem Umluftofen (Memmert, Schwabach) erwärmt und danach zur Rehydrierung in folgende Bäderfolge eingebracht.

- 2 x 5 Minuten in Xylol
- 2 x 1 Minute in 98 % Ethanol
- 2 x 1 Minute in 96 % Ethanol
- 2 x 1 Minute in 70 % Ethanol
- 2 x 2 Minuten in *Aqua dest.*

### 2.3.3 Immunhistologische DAB-Färbung an Paraffinschnitten

Nach der Rehydrierung wurden die Schnitte in destilliertem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen, wurde mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte für 40 Minuten in einer Plastikkuvette, gefüllt mit Citratpuffer, bei pH 6 gekocht. Nach dem Kochen wurden die Schnitte für mindestens 20 Minuten abgekühlt und danach in destilliertes H<sub>2</sub>O gestellt.

Anschließend wurden sie für 5 Minuten in Tris buffered saline (TBS) belassen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen der Antikörper wurde mit 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,2 % Glycin in TBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blockieren wurden die Primär-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in einem Endvolumen von 50 µl pro Schnitt aufgetragen. Die verwendeten TLR2- und TLR4- Antikörper (Abcam, Cambridge, USA) sind polyklonal und entstammen dem Kaninchen. Die Antikörper wurden in den humanen Paraffinschnitten in einer Endkonzentration von 1:100 benutzt.

Die Inkubation erfolgte bei den verwendeten primären Antikörpern bei 4 °C über Nacht. Um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden diese in angefeuchteten und überdeckelten Kammern im Kühlschrank gelagert. Es wurde stets eine Negativkontrolle angefertigt. Hierzu wurde anstelle des primären Antikörpers 50 µl TBS pro Schnitt aufgetragen. Ansonsten wurde die Negativkontrolle genauso behandelt wie die übrigen Proben. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten mit TBS gespült. Als Sekundär-Antikörper gegen die primären polyklonalen Kaninchen-Antikörper wurden biotinylierte Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Konzentration von 1:600 eingesetzt. Diese peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden, in TBS gelöst, für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte erneut für 5 Minuten mit TBS gespült. Danach wurde der StreptAB Complex HRP (DAKO, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten aufgetragen. Der mit Peroxidase gekoppelte Komplex aus Avidin und Biotin dient der Verstärkung der Signale und wurde bereits 30 Minuten vor dem Auftragen angesetzt.

Die 3,3'-Diamino-Benzidin- (DAB-) Reaktion wurde mithilfe des von BioGenex (BioGenex, San Ramon, USA) mitgelieferten 10x Puffers, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und DAB in den von dem Hersteller angegebenen Volumina durchgeführt und auf die Schnitte pipettiert. Durch die enzymatische Umsetzung von DAB entsteht ein braunes Reaktionsprodukt. Nach 5 bis 10 Minuten Reaktionszeit wurden die Objektträger zum Stoppen der Reaktion in destilliertes H<sub>2</sub>O gestellt. Die Gegenfärbung wurde mit Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte für circa 5 Sekunden in die Lösung gestellt und anschließend in

Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden mit einem Deckglas (Menzel GmbH & Co KG, Freiburg) versehen und mit Glycergel (DAKO, Glostrup, Dänemark) eingedeckelt. Nach Trocknung wurden die Schnitte unter dem Mikroskop untersucht.

### **2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten**

Die Entparaffinierung und Rehydrierung für die Immunfluoreszenzschnitte erfolgte in gleicher Weise wie bei den für die oben genannte DAB-Färbung verwendeten histologischen Schnitten. Im Anschluss an die absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte in Citratpuffer bei pH 6 für 40 Minuten gekocht.

Nach einer Abkühlungszeit von mindestens 20 Minuten wurde für 30 Minuten in 1 % Natrium-Borohydrid inkubiert, um Autofluoreszenzen in der Dermis zu unterdrücken. Nun wurden die Schnitte für 2 Minuten in 20 % Ethanol und für weitere 2 Minuten in 70 % Ethanol inkubiert. Danach wurden sie für 10 Minuten in 70 % Ethanol mit 1 % Sudan-Schwarz inkubiert. Die Schnitte wurden in 70 % Ethanol geklärt, bis kein schwarzer Farbstoff mehr abgegeben wurde. Im Folgenden wurden sie für 2 Minuten in 20 % Ethanol gespült. Vor dem Blockieren mit 0,1 % BSA und 0,2 % Glycin in TBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur, wurde zweimal für 10 Minuten mit TBS gespült. Die Färbung mit den Primär-Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Hierfür wurden dieselben Primär-Antikörper wie für die DAB-Färbung verwendet.

Die Antikörper wurden, gelöst in der oben genannten Blockierungslösung, in einer Endkonzentration von 1:100 verwendet. Nach der Inkubation mit den Primär-Antikörpern wurde zweimal für jeweils 5 Minuten mit TBS-T und dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS gespült. Als Sekundär-Antikörper wurde ein Cy2-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Jackson, Baltimore, USA) in einer Konzentration von 1:400 eingesetzt. Zum Anfärben der Zellkerne wurde der Farbstoff Hoechst33342 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml verwendet. Nach Applikation des Sekundär-Antikörpers wurde dieser für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einem abgedunkelten Raum inkubiert. Anschließend wurde zweimal für jeweils 5 Minuten mit TBS-T und dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS gespült.

Das Eindecken der Schnitte erfolgte in Antifade Gold (Invitrogen™, Karlsruhe), welches hierzu in einem Wasserbad auf 35 °C angewärmt wurde. Die Analyse erfolgte mit dem

Laserscan Mikroskop (LSM) 510 UV (Zeiss™, Jena) bei einem Wellenlängenbereich von 488nm. Die Auswertung wurde mit der LSM-Image Browse 4.2 Software (Zeiss™, Jena) durchgeführt.

## **2.4 Zelllinien**

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Keratinozyten, HaCaT-Zellen, THP-1-Zellen, Lymphozyten und Monozyten handelt es sich um schon bestehende Zellen des Forschungslabors der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, welche mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

## **2.5 RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung von kultivierten humanen Keratinozyten erfolgte mit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA-II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers (siehe unten) und beinhaltete einen DNA-Verdauungsschritt. Die RNA-Isolierung aus Hautproben beziehungsweise aus isolierter Epidermis wurde mittels Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen™, Karlsruhe) durchgeführt. Die RNA der weiteren im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien war bereits vor Beginn des praktischen Teils dieser Arbeit vorhanden und wurden mir ebenfalls freundlicherweise durch das Forschungslabor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, zur Verfügung gestellt.

### **2.5.1 RNA-Isolierung mit NucleoSpin<sup>®</sup>RNA-II-Kit**

Die RNA-Isolierung aus humanen Keratinozyten wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Die Prozeduren sind im Folgenden aufgeführt:

Zum Lysieren der Zellen wurden diese zunächst mit 350 µl RA1 Puffer und 3,5 µl Mercaptoethanol versetzt. Anschließend erfolgte die Filtration durch die NucleoSpin Filtereinsätze (1 Minute zentrifugieren bei 11000 x g) sowie die Zugabe von 350 µl 70 %

Ethanol. Die RNA-Bindung an die Silica-Membran der NucleoSpin RNA II Säulen erfolgte unter Zentrifugation für 30 Sekunden bei 11000 x g. Das Entsalzen der Silica-Membran wurde durch Zugabe von 350 µl Membran Desalting Buffer (MDB) und der DNase-Verdau auf der Membran mit Qiagen RNase-free DNase (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit 600 µl RA3 Puffer erfolgte die Abzentrifugation für 2 Minuten bei 11000 x g. Anschließend wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O unter Zentrifugation für 2 Minuten bei 11000 x g eluiert.

### **2.5.2 RNA Isolierung mittels Trizol®**

Die gefrorenen Hautpräparate wurden in Kryotubes mit jeweils 6-8 Keramikugeln aus Zirkoniumoxid von 2.8mm Durchmesser (PeqLab, Erlangen) und 1ml Trizol® (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Homogenisator bei 6500 x g sechsmal für 20 Sekunden vollständig homogenisiert. Anschließend wurde jede Probe mit jeweils 200 µl Chloroform versetzt, gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten mit 12000 x g bei 4 °C kam es zur Bildung von drei Phasen. Die wässrige-Phase, welche die RNA enthielt, wurde von der Chloroform-Phenol-Phase sowie der Interphase getrennt und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurde sie mit 500 µl Isopropanol versetzt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Danach wurde für 10 Minuten mit 12000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml 70 % Ethanol bei 7500 x g für 5 Minuten gewaschen. Danach wurde es in 30 µl *Aqua dest.* aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

## **2.6 RNA-Quantifizierung und Qualitätskontrolle**

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mithilfe des Photospectrometers NanoDrop 1000® (NanoDrop, peQLab, Wilmington, USA) ermittelt. Hierzu wurden die Proben mit 1,5 µl H<sub>2</sub>O kalibriert. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Ausmaß der Extinktion der Proben bei 260 nm. Zur Qualitätskontrolle der Proben wurde das Extinktionsverhältnis bei 260 und 280 nm untersucht. Abweichende Extinktionsverhältnisse deuten auf Proteinverunreinigung hin und wurden verworfen.

## 2.7 Desoxribonuklease-Verdau

Um Verunreinigungen der verwendeten RNA mit DNA entgegenzuwirken wurde bei den verwendeten Proben ein DNA-Verdau durchgeführt.

Es wurden für einen 10 µl-Ansatz 1 µg RNA mit 1 U DNase I (Promega, Madison, USA) sowie 1 µl des mitgeliefertem DNase-Puffers und 9 µl H<sub>2</sub>O versetzt. Anschließend erfolgte der DNA-Verdau bei 37 °C und wurde nach 30 Minuten mittels Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA sowie unter Temperaturerhöhung für 10 Minuten auf 65 °C gestoppt.

## 2.8 Reverse Transkription

Die Synthese eines cDNA-Stranges erfolgte durch reverse Transkription (RT). Im Einzelnen wurden zur reversen Transkription der RNA-Proben 5 µg RNA mit 10 µl ribonukleasefreiem H<sub>2</sub>O verdünnt und zusätzlich mit 1 µl Oligodesoxythymidin-Lösung (Invitrogen™, Karlsruhe) versetzt. Zur Denaturierung wurde dieser Ansatz für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt. Nach Zugabe des Enzymgemisches wurde für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Das Enzymgemisch bestand aus 4 µl 5x-RT-Puffer (Invitrogen™, Karlsruhe), 2 µl einer 0,1 M Dithiothreitollösung, 1 µl einer 2 mM Desoxyribonukleotidtriphosphatlösung und aus 200 U der reversen Transkriptase Superscript-plus-II (Invitrogen™, Karlsruhe) je Probe. Die anschließende Enzyminaktivierung erfolgte durch Inkubation für 15 Minuten bei 70 °C. Durch Zugabe von 80 µl ribonukleasefreiem H<sub>2</sub>O wurde der Ansatz verdünnt und zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.9 Realtime-PCR

Im Anschluss an die reverse Transkription von mRNA wurde eine Realtime-PCR durchgeführt. Mithilfe des Lightcyclers (Roche), einer PCR-Maschine, wird nach jedem Zyklus die Inkorporation eines mit DNA-interkalierendem Fluoreszenzfarbstoffes optisch mittels eines Lasers gemessen. Eine Fluoreszenzzunahme entspricht einer Zunahme an doppelsträngiger DNA. Zur Herstellung des PCR-Reaktions-Gemisches wurde 1 µl cDNA mit



3,6 µl *Aqua dest.*, je 0,2 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 5 µl SYBR-Premix der Firma (TaKaRa, Otsu, Japan) zu einem Gesamtvolumen von 10 µl vermischt. Der SYBR- Premix enthält Polymerase-, Nukleotide- und Mg<sup>2+</sup> Ionenkonzentrationen. Zur Überprüfung einer eventuellen Kontamination der Reaktionsansätze mit DNA wurde stets eine Negativkontrolle mit sterilem H<sub>2</sub>O anstelle von cDNA durchgeführt. Die Proben wurden in Lightcycler-Kapillaren (Roche, Basel, Schweiz) pipettiert und zentrifugiert.

Folgende Primersequenzen wurden verwendet:

TLR2	Vorwärts	5'-TGT GAA CCT CCA GGC TCT G-3'
	Rückwärts	5'-GTG CAT ATT TCC CAC TCT CAG G-3'
TLR4	Vorwärts	5'-CTG CAA TGG ATC AAG GAC CA-3'
	Rückwärts	5'-TTA TCT GAA GGT GTT GCA CAT-3'
GAPDH	Vorwärts	5'-CCA GCC GAG CCA CAT CGC TC-3'
	Rückwärts	5'-ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3'

**Tab. 2: Darstellung der verwendeten Primersequenzen**

Anschließend wurde die PCR als sogenannte Touch-down-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die Annealing-Temperatur in den ersten sechs Zyklen um jeweils 1 °C bis auf 60 °C herabgesetzt. Ab dem siebten Zyklus wurde die Temperatur konstant gehalten. Es wurden insgesamt 45 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt.

**Denaturierung** 95 °C 20 Sekunden

**Primeranlagerung** (Annealing) 66 – 60 °C für 20 Sekunden

**Polymerisation** (Elongation) 72 °C für 20 Sekunden bei GAPDH sowie TLR2 und TLR4

Die Auswertung der Expression des untersuchten Gens erfolgte in Relation zur Genexpression des Housekeeping-Gens GAPDH, welches essentiell für die Aufrechterhaltung des Zellorganismus ist und in allen Zellen exprimiert wird. Die Ermittlung der Expression des

Zielgens in Relation zur GAPDH-Expression dient als Qualitätskontrolle sowie als Maß für die in die PCR eingesetzte cDNA Menge.

## **2.10 Gelelektrophorese**

Zur Überprüfung der Größe der PCR-Produkte wurde ein 2 % Agarose Gel hergestellt. Hierzu wurden 2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Nach kurzem Abkühlen des Gemisches wurden 5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel hinzugefügt und das Gel gegossen. Dabei komplexiert das im Gel enthaltene Ethidiumbromid mit DNA, so dass die PCR-Produkte unter UV-Beleuchtung fluoreszieren. Das polymerisierte Gel wurde im weiteren Verlauf in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt. Anschließend wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl des DNA-Laufpuffers vermischt und separat in die Taschen des Gels pipettiert. Der Laufpuffer setzte sich aus 475 µl Formamid, 8 µl 0,5 M EDTA und 25 µl Bromphenolblau/Xylencyanol zusammen. Als Größenstandard wurden zusätzlich 5 µl einer Ready-Load™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™, Karlsruhe) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 80 V an die Gelkammer angelegt und das Gel für 60 Minuten laufen gelassen. Zur Dokumentation der Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung wurde die BioDoc-Foto-Dokumentationsanlage (Biometra, Göttingen) verwendet, indem die Banden bei 302 nm auf dem UV-Transluminator Chroma 42 (Vetter, Wiesloch) sichtbar gemacht wurden.

## **2.11 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der histologischen Schnittbilder erfolgte in Anlehnung an den „Remmele-Score“ (Remmele und Stegner 1987). Der „Remmele-Score“, auch immunreaktiver Score (IRS) genannt, wird überwiegend zur Beurteilung immunreaktiver Zellen beim Mammakarzinom verwendet. In einer modifizierten Version ist dieser Score jedoch auch zur Beurteilung immunreaktiver Zellen in der Haut geeignet. Wir haben die zytoplasmatische Farbintensität einer jeden Epidermisschicht, sofern eine Abgrenzung möglich war, individuell beurteilt, um Expressionsunterschiede der einzelnen epidermalen Bereiche darzustellen. Hierbei wurde die Farbintensität von mehreren unabhängigen, fachkundigen Personen

beurteilt und mit einem Wert versehen. Die Ergebnisse der Untersucher wurden dann anhand der Mittelwertbildung beurteilt und statistisch ausgewertet.

Punkte	Zytoplasmatische Farbintensität (ausgewertet für jede Hautschicht)
0	keine Färbereaktion
1	schwache Färbereaktion
2	mäßige Färbereaktion
3	starke Färbereaktion
4	sehr starke Färbereaktion

**Tab. 3: Darstellung des Auswertungsschematas**

Statistische Signifikanzen wurden mithilfe des Student-t-Tests errechnet. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  von weniger als 5 % ( $p < 0,05$ ) als signifikant betrachtet und mit einem Stern markiert. Zur Erstellung der Balkendiagramme und für die Berechnung der Mittelwerte, Mittelwertabweichungen und Signifikanzen wurde das Programm Microsoft Office Excel<sup>®</sup> verwendet.

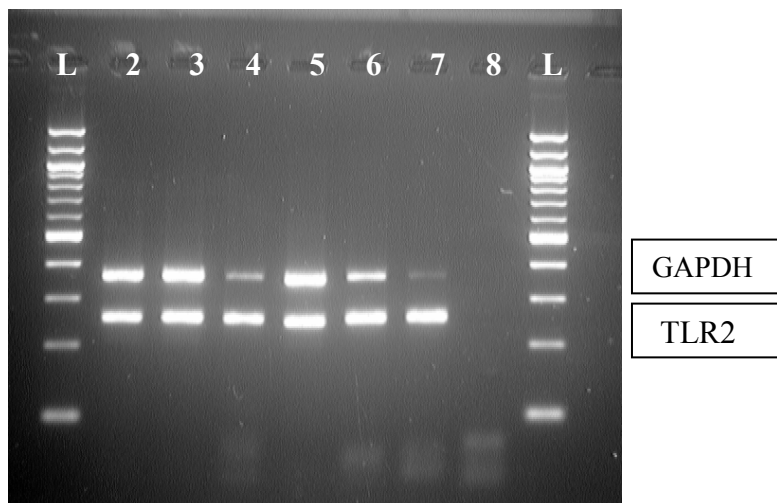
## 2.12 Mikroskopische Untersuchung und fotografische Dokumentation

Die Analyse der histologischen Schnitte erfolgte mit einem Mikroskop HBO 50/AC, Axioskop 50 (Zeiss, Jena). Zur fotografischen Dokumentation wurde die Kamera Axiocam HRc (Zeiss, Jena) herangezogen. Die Analyse der Immunfluoreszenzbilder erfolgte mit dem laser scan microscope (LSM) 510 UV (Zeiss Jena). Die Auswertung wurde mit freeware LSM-Browser (Zeiss, Jena), durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 TLR2- und TLR4-mRNA wird konstitutiv in humanen Keratinozyten exprimiert

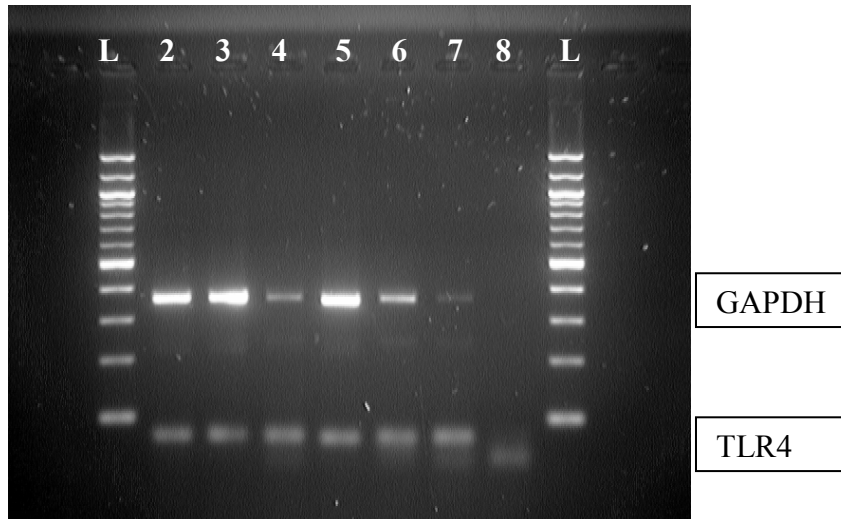
Um TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten nachzuweisen, wurde zunächst die cDNA gewonnen. Zusätzlich wurde cDNA von unstimulierten HaCaT-Zellen, primären humanen Keratinozyten, gesunder humaner Haut (Epidermis), THP-1-Zellen, Monozyten und Lymphozyten gewonnen. Die im Anschluss durchgeführte Realtime-PCR zeigte eine konstitutive Expression für TLR2 und TLR4 in primären humanen Keratinozyten, in THP-1-Zellen sowie in Monozyten und Lymphozyten, welche als Positivkontrolle dienten. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde stets eine Wasserkontrolle parallel untersucht. Abb. 3.1 und 3.2 zeigen die gelelektrophoretische Auftrennung der verschiedenen Realtime-PCR.



**Abb. 3.1: TLR2 wird in primären humanen Keratinozyten, THP-1-Zellen, Monozyten und Lymphozyten konstitutiv exprimiert**

Neben der TLR2-mRNA- und GAPDH-Expression in humanen Keratinozyten wurde die TLR2-mRNA- und GAPDH-Expression von weiteren Zelltypen exemplarisch dargestellt. L = 100-Basenpaar-DNA-Leiter, 2 = HaCaT-Zellen, 3 = primäre Keratinozyten, 4 = Haut (Epidermis), 5 = THP-1 (Positivkontrolle), 6 = Monozyten (Positivkontrolle), 7 = Lymphozyten (Positivkontrolle), 8 = Negativkontrolle, L = 100-Basenpaar-DNA-Leiter. Die im Bild dargestellten Banden entsprechen den erwarteten Größen von GAPDH 360 bp und humanem TLR2 256 bp.

Die PCR für GAPDH und die PCR für TLR2 wurden getrennt durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte derselben cDNA-Probe wurden in eine gemeinsame Tasche des Gels pipettiert, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet.



**Abb. 3.2: TLR4 wird in primären humanen Keratinozyten, THP-1-Zellen, Monozyten und Lymphozyten konstitutiv exprimiert**

Neben der TLR4-mRNA- und GAPDH-Expression in humanen Keratinozyten wurde ferner die TLR4-mRNA- und GAPDH-Expression von weiteren Zelltypen exemplarisch dargestellt.

L = 100-Basenpaar-DNA-Leiter, 2 = HaCaT-Zellen, 3 = primäre Keratinozyten, 4 = Haut(Epidermis), 5 = THP-1 (Positivkontrolle), 6 = Monozyten (Positivkontrolle), 7 = Lymphozyten (Positivkontrolle), 8 = Negativkontrolle, L = 100-Basenpaar-DNA-Leiter

Die im Bild dargestellten Banden entsprechen den erwarteten Größen von GAPDH 360 bp und humanem TLR4 74 bp. Die PCR für GAPDH und die PCR für TLR4 wurden getrennt durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte derselben cDNA-Probe wurden in eine gemeinsame Tasche des Gels pipettiert, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet. Die GAPDH in Bande 4 und Bande 7 erscheint im Vergleich zu den anderen Banden abgeschwächt.

## 3.2 Immunhistologische DAB-Färbung an Paraffinschnitten von gesunder und erkrankter Haut

Die Paraffinschnitte von gesunder sowie erkrankter Haut wurden im Bereich der Dermis und der Epidermis auf die Verteilung und Intensität der Immunreaktion von TLR2 und TLR4 mit Hilfe eines polyklonalen, aus dem Kaninchen stammenden Antikörpers (Abcam, Cambridge, USA) untersucht. Die Auswertung der Schnitte bezieht sich auf das Verteilungsmuster, die Intensität der Anfärbung sowie Art des subzellulären Färbemusters (granulär beziehungsweise homogen) im Bereich der Epidermis. Exemplarisch dargestellt werden einzelne Schnitte, die jeweils ein für die Erkrankung spezifisches Bild widerspiegeln.

### 3.2.1 TLR2-Expressionsmuster bei Normalhäuten

Die Anfärbung auf TLR2 bei Normalhäuten wurde an 5 Präparaten durchgeführt. Sie stellt sich außer im *Str. corneum* in allen Schichten überwiegend gleich dar. Das *Str. corneum* wurde in 2 Präparaten mit angefärbt. Die Intensitätsunterschiede der einzelnen Schichten im Vergleich zueinander erreichten kein statistisch signifikantes Niveau.

Das subzelluläre Färbemuster war unabhängig von der Zellschicht, in einigen Zellen sowohl homogen als auch granulär. Es zeigt sich eine starke Immunreaktion in der Dermis.

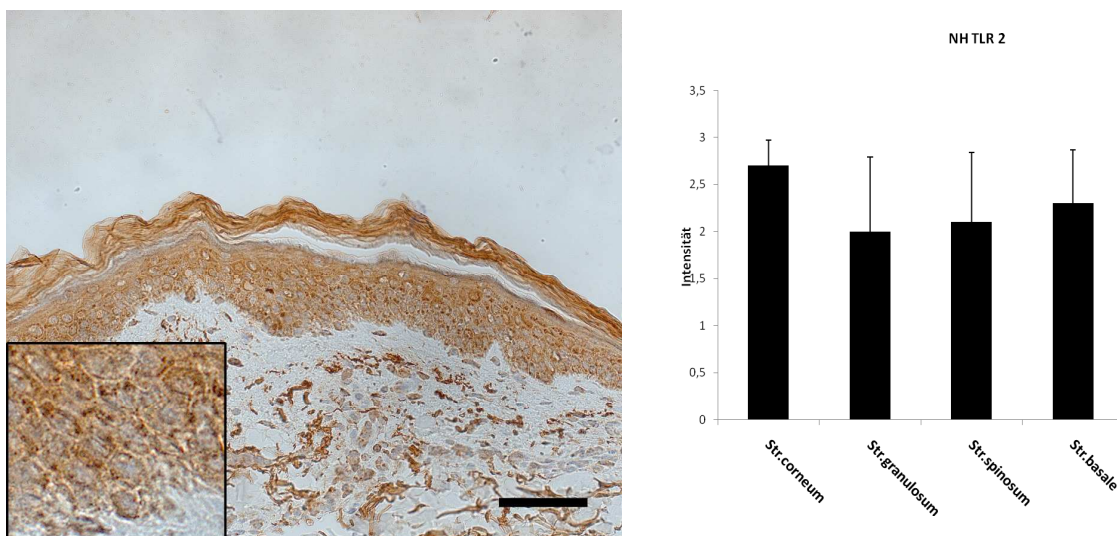


Abb. 3.5: TLR2-Expressionsmuster bei Normalhäuten

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer DAB-Färbung auf TLR2 eines Normalhautpräparates. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Das Diagramm zeigt das Expressionsmuster von TLR2 innerhalb der Epidermisschichten von 5 ausgewerteten Präparaten. Unterschiede zwischen den einzelnen Schichten erreichten kein signifikantes Niveau. Das subzelluläre Färbemuster ist überwiegend granulär. Die Färberegebnisse waren in allen Präparaten ähnlich. Das abgebildete Präparat ist exemplarisch für die übrigen.

### 3.2.2 TLR2-Expressionsmuster bei atopischem Ekzem

Die Anfärbung auf TLR2 bei atopischem Ekzem wurde an 9 paraffinfixierten Präparaten durchgeführt. Es zeigte sich im *Str. basale*, *Str. spinosum* und im *Str. granulosum* eine starke Anfärbung. Das *Str. corneum* wurde in 2 von 9 Fällen schwach angefärbt. Die übrigen 7 Präparate zeigten keine Immunreaktion im *Str. corneum*.

Die starke Färbung des *Str. basale* gegenüber dem *Str. granulosum* erreichte einen statistisch signifikanten Unterschied. Die Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung im *Str. spinosum* war im Vergleich zur Färbeintensität des *Str. granulosum* erhöht und erreichte ebenfalls ein statistisch signifikantes Niveau. Im Vergleich zur Normalhaut zeigte sich bei atopischem Ekzem das Bild einer intensiven basalen Anfärbung. Das subzelluläre Färbemuster ist in den basalen Zelllagen überwiegend granuliert. In den apikalen Bereichen der Epidermis erscheint die Färbung wesentlich homogener und nur in einzelnen Zellen granuliert. In Bereichen der papillären Dermis fanden sich gehäuft TLR2 positive Zellen.

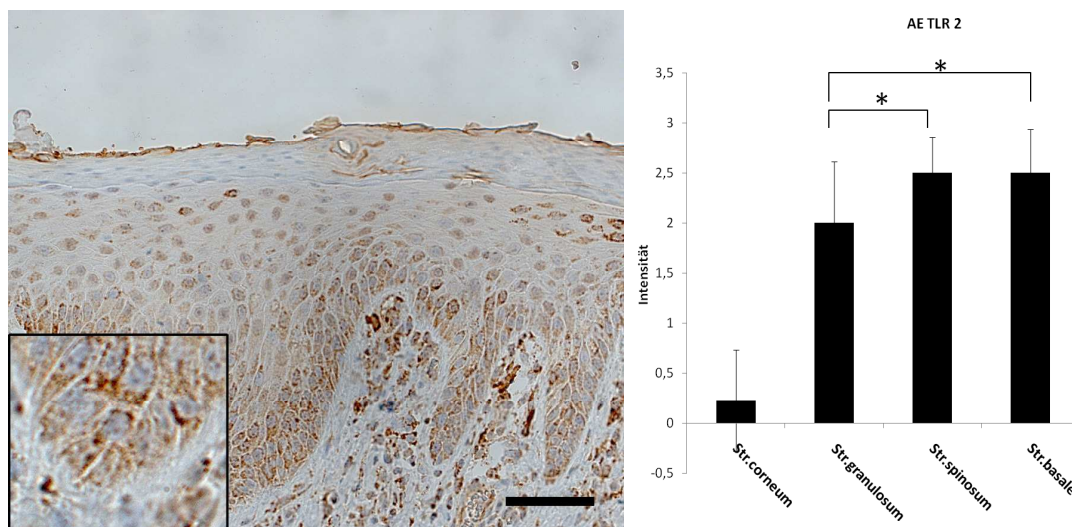


Abb. 3.5: TLR2-Expressionsmuster bei atopischem Ekzem

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer DAB-Färbung auf TLR2 bei atopischem Ekzem. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Das Diagramm zeigt Expressionsunterschiede innerhalb der Epidermisschichten von 9 ausgewerteten Präparaten. Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) wurden mit einem Stern versehen. Die gelegentliche Anfärbung des *Str. corneum* wurde als unregelmäßig gewertet und ihre Signifikanz daher nicht beurteilt.

### 3.2.3 TLR2-Expressionsmuster bei Psoriasis

Die Anfärbung auf TLR2 bei Psoriasis wurde an 12 paraffinfixierten Präparaten durchgeführt und zeigte im *Str. basale* eine starke Anfärbung. *Str. spinosum* und *Str. granulosum* sind im Vergleich zum *Str. basale* schwächer angefärbt. Das *Str. corneum* wurde in 2 von 12 Präparaten schwach angefärbt. Die übrigen 10 Präparate zeigten keine Immunreaktion im *Str. corneum*.

Die starke Färbung des *Str. basale* gegenüber dem *Str. granulosum* erreichte einen statistisch signifikanten Unterschied. Die Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung ist im *Str. basale* gegenüber der Färbeintensität des *Str. spinosum* erhöht und erreichte ebenfalls ein statistisch signifikantes Niveau. Die Färbeintensität nimmt von basal nach apikal ab. Das subzelluläre Färbemuster war sowohl in den apikalen als auch in den basalen Bereichen überwiegend granulär. In der Dermis fanden sich im Vergleich zur Normalhaut und zum atopischen Ekzem deutlich weniger TLR2 positive Zellen.

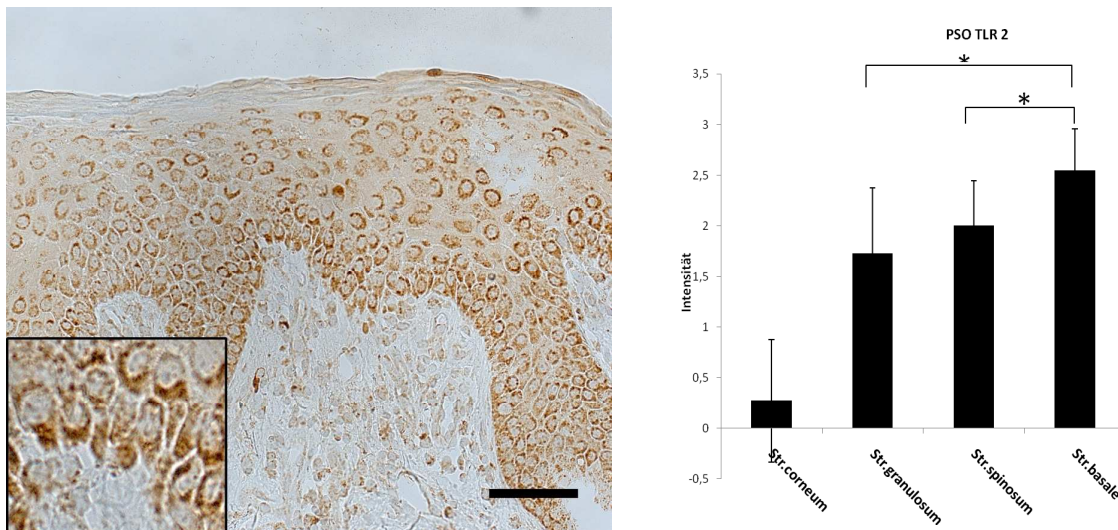


Abb. 3.7: TLR2-Expressionsmuster bei Psoriasis

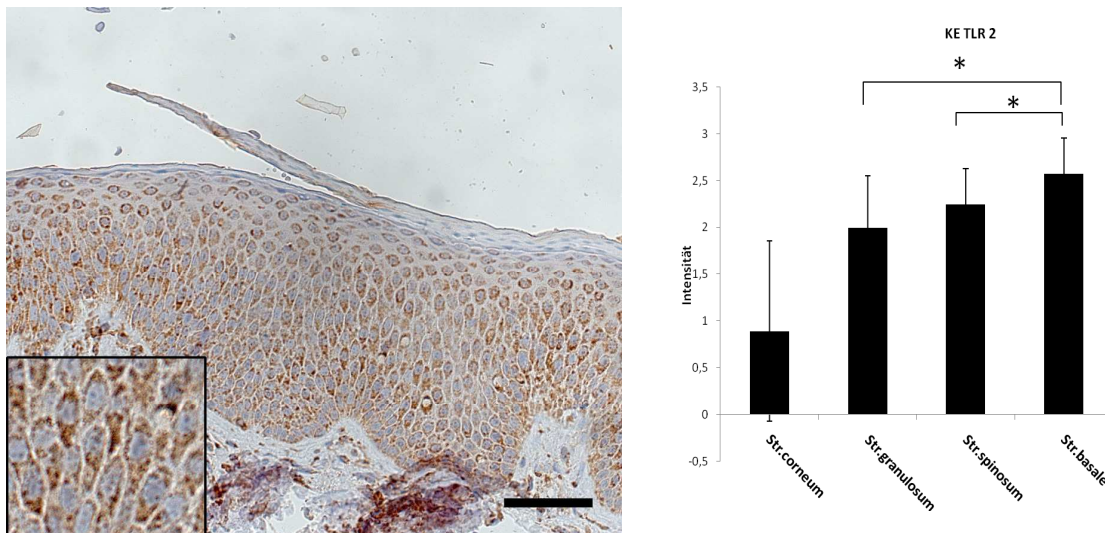


Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer DAB-Färbung auf TLR2 bei Psoriasis. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Das Diagramm zeigt Expressionsunterschiede innerhalb der Epidermisschichten von 12 ausgewerteten Präparaten. Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) wurden mit einem Stern versehen. Die gelegentliche Anfärbung des *Str. corneum* wurde als unregelmäßig gewertet und ihre Signifikanz daher nicht beurteilt.

### 3.2.4 TLR2-Expressionsmuster bei Kontaktekzem

Die Anfärbung auf TLR2 bei Kontaktekzem wurde an 12 Präparaten durchgeführt und zeigt im *Str. basale* eine starke Anfärbung. *Str. spinosum* und *Str. granulosum* stellten sich im Vergleich zum *Str. basale* schwächer gefärbt dar. Das *Str. corneum* wurde in 8 von 12 Präparaten schwach angefärbt. 4 Präparate zeigten keine Immunreaktion im *Str. corneum*.

Die starke Färbung des *Str. basale* gegenüber dem *Str. granulosum* erreichte einen statistisch signifikanten Unterschied. Die Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung im *Str. basale* war im Vergleich zur Färbeintensität des *Str. spinosum* erhöht und erreichte ebenfalls ein statistisch signifikantes Niveau. Im Vergleich zu Normalhautpräparaten war das subzelluläre Färbemuster überwiegend granulär. Lediglich das *Str. granulosum* wies an der Grenze zum *Str. corneum* eine eher homogene und wenig granuläre Färbung auf.



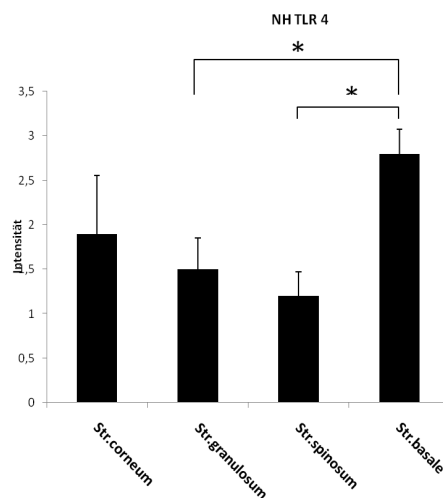
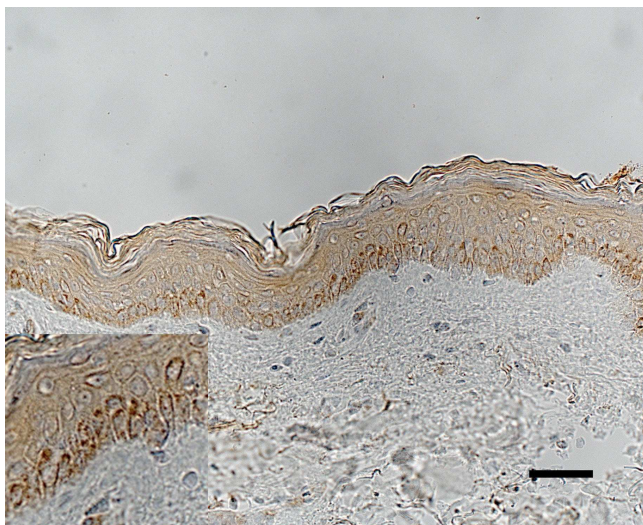
**Abb. 3.8: TLR2-Expressionsmuster bei Kontaktekzem**

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer DAB-Färbung auf TLR2 eines Kontaktekzemes. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Das Diagramm zeigt Expressionsunterschiede innerhalb der Epidermisschichten von 12 ausgewerteten Präparaten.

Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) wurden mit einem Stern versehen. Die gelegentliche Anfärbung des *Str. corneum* wurde als unregelmäßig gewertet und ihre Signifikanz daher nicht beurteilt.

### 3.2.5 TLR4-Expressionsmuster in Normalhäuten

Die Anfärbung auf TLR4 bei Normalhäuten wurde an 5 Präparaten durchgeführt. Im Bereich des *Str. basale* war eine verstärkte Anfärbung sichtbar. Am Übergang des *Str. basale* zum *Str. spinosum* lässt die Farbeintensität deutlich nach. Die apikalen Schichten waren gleichmäßig schwach gefärbt. Insgesamt erschien die Färbung schwächer als bei den auf TLR2 angefärbten Normalhautpräparaten. Die stärkere Färbung des *Str. basale* gegenüber der Farbintensität des *Str. spinosum* und des *Str. granulosum* erreichte einen statistisch signifikanten Unterschied. Das subzelluläre Färbemuster war im *Str. basale* überwiegend granulär. Die apikalen Zellschichten erschienen homogen und wenig granulär. Im Vergleich zu den immunhistochemischen Färbungen auf TLR2 bei Normalhäuten sind bei der immunhistochemischen Färbung auf TLR4 nur vereinzelt TLR4-positive Zellen in der Dermis zu finden. Darüber hinaus ließ sich bei den auf TLR4 angefärbten Normalhautpräparaten im Gegensatz zu den auf TLR2 angefärbten Normalhautpräparaten klar zwischen granulär und homogen angefärbten Zellen unterscheiden. Während die granulär angefärbten Zellen bei TLR2 angefärbten Normalhautpräparaten diffus verteilt waren, ließen sich die granulär angefärbten Zellen bei den auf TLR4 angefärbten Normalhautpräparaten klar dem *Str. basale* und einigen vereinzelt TLR4-positiven Zellen im Bereich der Dermis zuordnen.



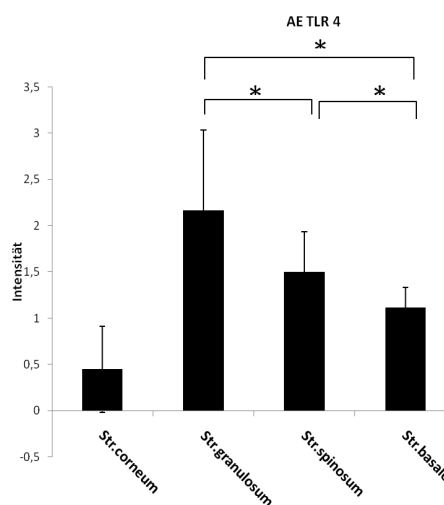
### Abb. 3.9: TLR4-Expressionsmuster bei Normalhäuten

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer DAB-Färbung auf TLR4 eines Normalhautpräparates. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Das Diagramm zeigt ein für die Normalhaut typisches Expressionsmuster innerhalb der Epidermisschichten von 5 ausgewerteten Präparaten.

### 3.2.6 TLR4-Expressionsmuster bei atopischem Ekzem

Die Anfärbung auf TLR4 bei atopischem Ekzem wurde an 9 paraffinfixierten Präparaten durchgeführt. Es zeigte sich eine starke Immunreaktion im *Str.granulosum*. Das *Str. corneum* wurde in 3 von 9 Fällen angefärbt. Die übrigen 6 Präparate zeigten keine Immunreaktion im *Str.corneum*. Die starke Färbung des *Str. granulosum* gegenüber dem *Str. spinosum* erreichte einen statistisch signifikanten Unterschied. Die Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung im *Str. spinosum* war im Vergleich zur Färbeintensität des *Str. basale* erhöht und erreichte ebenfalls ein statistisch signifikantes Niveau. Anders als bei den Normalhautpräparaten stellte sich bei atopischem Ekzem die Anfärbung auf TLR4 eher apikal verstärkt dar.

Das *Str. granulosum* wies die stärkste Färbeintensität auf. Darüber hinaus konnte keine intensive Anfärbung des *Str. basale*, wie sie in den auf TLR4 angefärbten Normalhautpräparaten sichtbar war, festgestellt werden. Das subzelluläre Färbemuster ist durchweg homogen. Es ließ sich in keinem der 9 auf TLR4 angefärbten Präparate von Patienten mit atopischem Ekzem ein granuläres Färbemuster wie bei den Normalhautpräparaten nachweisen.



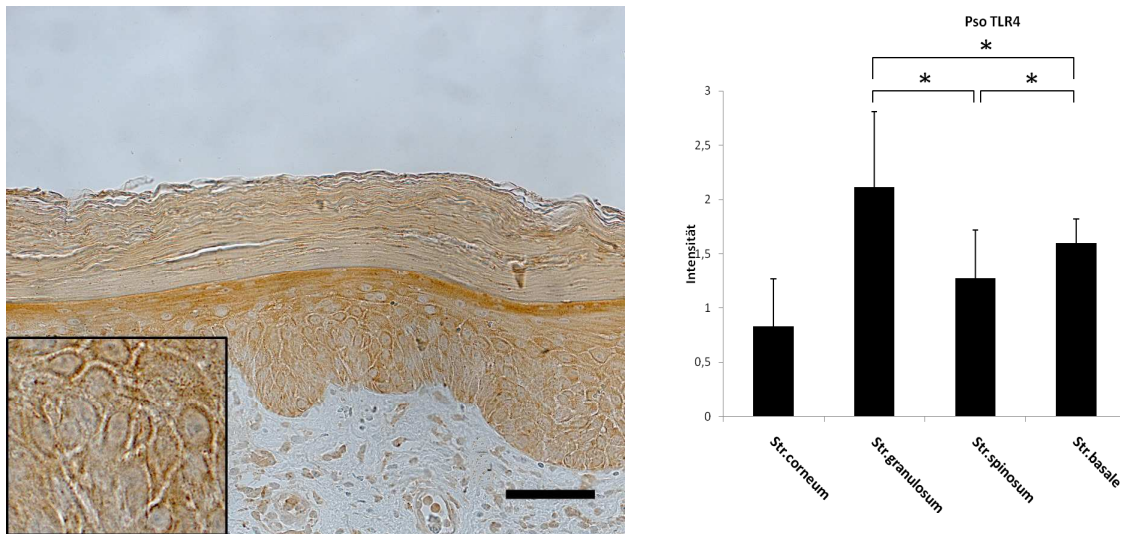
**Abb. 3.10: TLR4-Expressionsmuster bei atopischem Ekzem**

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer DAB-Färbung auf TLR4 bei atopischem Ekzem. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Das Diagramm zeigt Expressionsunterschiede innerhalb der Epidermisschichten von 9 ausgewerteten Präparaten. Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) wurden mit einem Stern versehen. Die gelegentliche Anfärbung des *Str. corneum* wurde als gelegentlich gewertet und die Signifikanz deshalb nicht beurteilt.

**3.2.7 TLR4-Expressionsmuster bei Psoriasis**

Die Anfärbung auf TLR4 bei Psoriasis wurde an 12 paraffinfixierten Präparaten durchgeführt. Es zeigte sich eine starke Immunreaktion im *Str. granulosum*. Das *Str. corneum* ist in 8 von 12 Fällen angefärbt. Die übrigen 4 Präparate zeigten keine Immunreaktion im *Str. corneum*. Die starke Färbung des *Str. granulosum* erreichte gegenüber der Färbung im *Str. spinosum* und *Str. basale* ein statistisch signifikantes Niveau. Die Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung im *Str. basale* war verglichen mit der Färbeintensität des *Str. spinosum* erhöht und erreichte ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied. Im Gegensatz zu den auf TLR4 angefärbten Normalhautpräparaten stellte sich bei der Anfärbung auf TLR4 bei der Psoriasis eine apikal verstärkte Färbung dar. Das *Str. basale* war intensiver als das *Str. spinosum* bei den auf TLR4 angefärbten Psoriasispräparaten angefärbt, jedoch ist dieser Unterschied deutlich geringer ausgeprägt als bei den Normalhautpräparaten.

Das subzelluläre Färbemuster war überwiegend homogen. Basal erschienen einige Zellen intrazellulär homogen angefärbt. Im Bereich der Dermis waren TLR4-positive Zellen nachweisbar, welche jedoch eine insgesamt deutlich schwächere Farbintensität als die TLR4-positiven Zellen bei den Normalautpräparaten im Bereich der Dermis aufwiesen. Zur näheren Überprüfung TLR4-positiver Zellen in der Dermis bei Psoriatikern wäre eine Doppelfärbung hilfreich, auf die im Rahmen dieser Arbeit verzichtet worden ist.



### Abb. 3.11: TLR4-Expressionsmuster bei Psoriasis

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer DAB-Färbung auf TLR4 bei Psoriasis. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Das Diagramm zeigt Expressionsunterschiede innerhalb der Epidermisschichten von 12 ausgewerteten Präparaten. Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) wurden mit einem Stern versehen. Die gelegentliche Anfärbung des *Str. corneum* wurde als unregelmäßig gewertet und ihre Signifikanz daher nicht beurteilt.

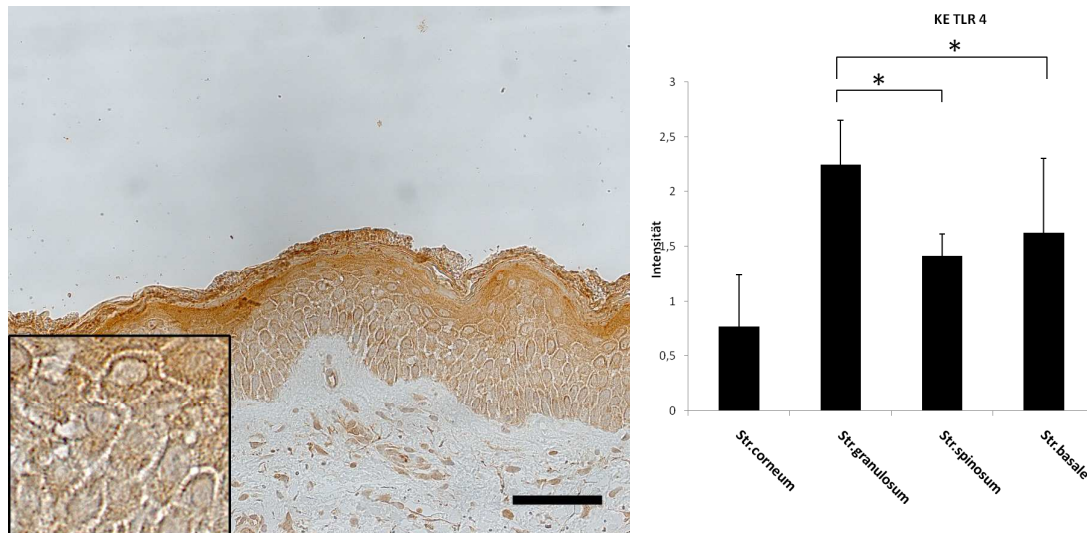
### 3.2.8 TLR4-Expressionsmuster bei Kontaktekzemen

Die Anfärbung auf TLR4 bei Kontaktekzemen wurde an 12 paraffinfixierten Präparaten durchgeführt. Es zeigte sich eine starke Immunreaktion im *Str. granulosum*. Die Intensität der immunhistochemischen Anfärbung des *Str. granulosum* variierte in einigen Abschnitten. Das *Str. corneum* war in 6 von 12 Fällen stark angefärbt. Die übrigen 6 Präparate zeigten keine Immunreaktion im *Str. corneum*.

Die starke Färbung des *Str. granulosum* erreichte gegenüber der Färbung im *Str. spinosum* und *Str. basale* einen statistisch signifikanten Unterschied. Das subzelluläre Färbemuster war in apikalen Bereichen homogen. Basal erschienen einige Zellen granulär. Im Vergleich zu Normalhautpräparaten stellte sich bei der Anfärbung auf TLR4 bei Kontaktekzemen eine eher apikal verstärkte Färbung dar.

Das *Str. granulosum* wies die stärkste Färbintensität auf. Darüber hinaus konnte keine intensive Anfärbung des *Str. basale* wie in den Normalhautpräparaten festgestellt werden. Das subzelluläre Färbemuster war überwiegend homogen. Es ließ sich in keinem der 12 auf

TLR4 angefärbten Präparate von Patienten mit Kontaktekzemen ein granuläres Färbemuster wie bei den Normalhautpräparaten nachweisen.



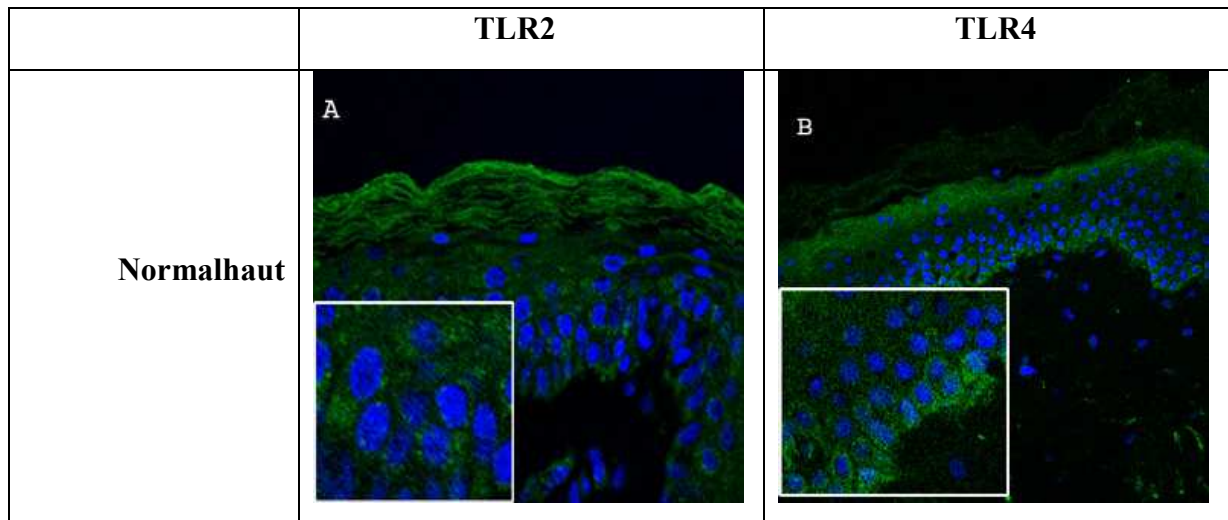
**Abb. 3.12: TLR4-Expressionsmuster bei Kontaktekzem**

Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer DAB-Färbung auf TLR4 eines Kontaktekzems. Der Maßstabsbalken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . Das Diagramm zeigt Expressionsunterschiede innerhalb der Epidermisschichten von 11 ausgewerteten Präparaten. Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) wurden mit einem Stern versehen. Die gelegentliche Anfärbung des *Str. corneum* wurde als unregelmäßig gewertet und ihre Signifikanz daher nicht beurteilt.

### 3.3 Subzelluläres Expressionsmuster von TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten von gesunder und erkrankter Haut

Um Rückschlüsse auf das subzelluläre Expressionsmuster von TLR2 und TLR4 schließen zu können und um unsere Ergebnisse aus der DAB-Färbung zu untermauern, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Mit Ausnahme der hier nicht abgebildeten Negativkontrollen, welche keinerlei Färbereaktion aufwiesen, konnte in gesunder Normalhaut, bei atopischem Ekzem, bei Psoriasis und beim Kontaktekzem ein deutliches Immunfluoreszenzsignal nachgewiesen werden. Alle Präparate wiesen für TLR2 und TLR4 eine intrazelluläre Expression beider Rezeptoren auf.

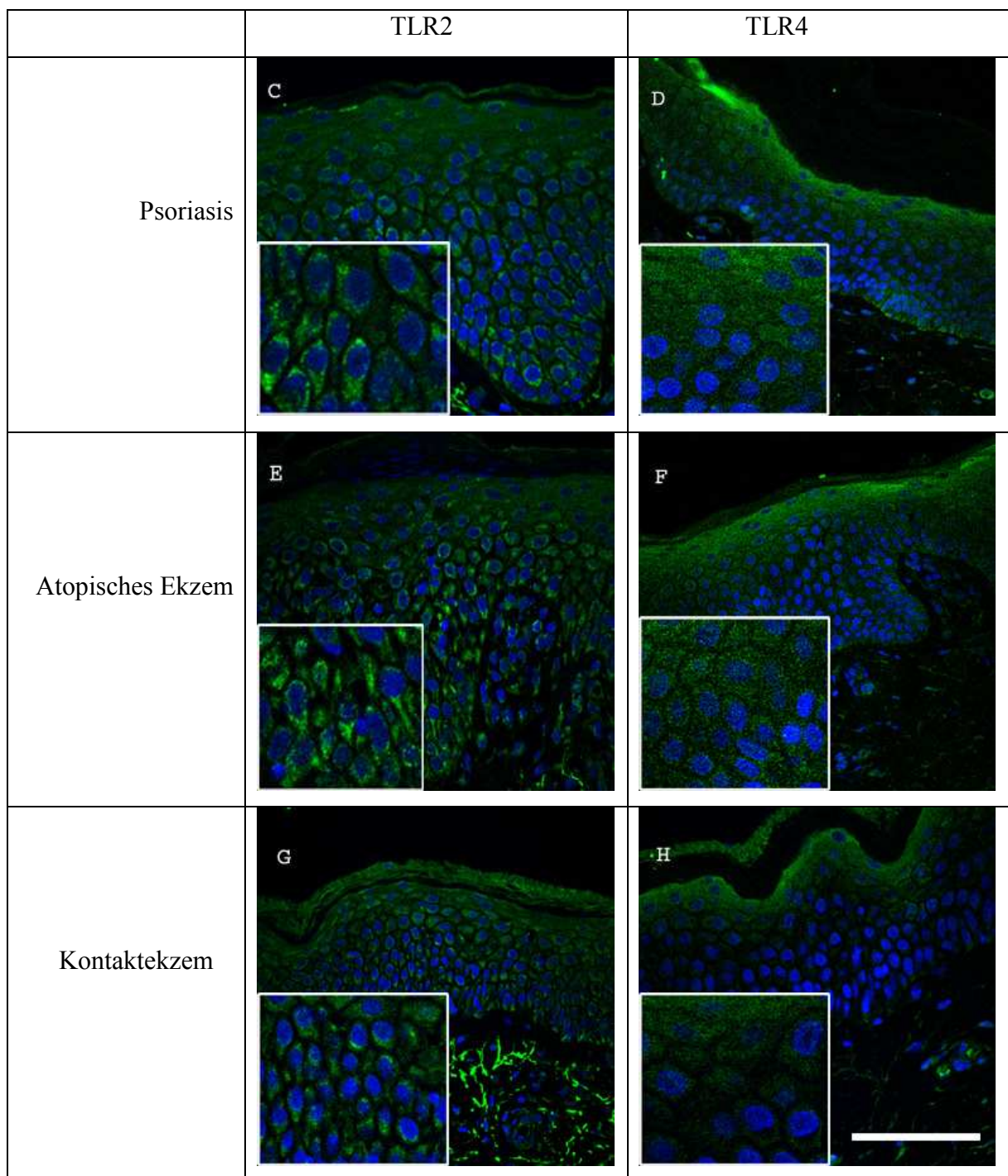
Das granuläre subzelluläre Muster ist in allen Präparaten von TLR2, insbesondere in den basalen Bereichen der Epidermis, sowie im Normalhautpräparat von TLR4 erkennbar. Das subzelluläre Muster von TLR4 erscheint im Zytoplasma homogen verteilt. Die Expressionsintensität von TLR4 ist bei Psoriasis, atopischem Ekzem und Kontaktekzem von basal nach apikal zunehmend.



**Abb. 3.13: TLR2 und TLR4 werden in gesunder Haut intrazellulär exprimiert.**

Zur Darstellung des subzellulären Expressionsmusters sowie der intraepidermalen Lokalisation von TLR2 und TLR4 in Keratinozyten bei gesunder Haut wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst-Farbstoff. Der Sekundärantikörper war mit Cy2 markiert. Die Präparate wurden vor der Auswertung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie stets vor UV-Licht geschützt, gelagert. **A** Immunfluoreszenzfärbung von TLR2 bei Normalhaut.

**B** Immunfluoreszenzfärbung von TLR4 bei Normalhaut.



**Abb. 3.14: TLR2 und TLR4 werden in erkrankter Haut intrazellulär exprimiert**

Zur Darstellung des subzellulären Expressionsmusters sowie der intraepidermalen Lokalisation von TLR2 und TLR4 in Keratinozyten erkrankter Haut wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst-Farbstoff. Der Sekundärantikörper war mit Cy2 markiert. Die Präparate wurden vor der Auswertung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie stets vor UV-Licht geschützt, gelagert. **C,E,G**; Darstellung der subzellulären Expression von TLR2 bei Psoriasis, atopischem Ekzem und bei Kontaktekzem. **D,F,H**; Darstellung der subzellulären Expression von TLR4 bei Psoriasis, atopischem Ekzem und bei Kontaktekzem.



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von TLR2 und TLR4 humaner Keratinozyten in Hinblick auf eine generelle Expression, auf Lokalisation und auf das subzelluläre Muster bei gesunder sowie pathologisch veränderter Haut *in vivo* und *in vitro* untersucht. Zu Beginn des praktischen Teils der Arbeit war bereits bekannt, dass TLR2 in humanen Keratinozyten exprimiert wird. Die Datenlage einiger Autoren bezüglich einer konstitutiven Expression von TLR4 in Keratinozyten sowie Aussagen über die intraepidermale Lokalisation beider Rezeptoren war jedoch umstritten. Eingehende Untersuchungen hinsichtlich Expressionsunterschieden zwischen atopischem Ekzem, Psoriasis und Kontaktekzem im direkten Vergleich mit gesunder Haut lagen zu Beginn des praktischen Teils der Dissertation nicht vor.

Um zu prüfen, ob TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten exprimiert werden, wurde die Expression sowohl in humanen Keratinozyten als auch in verschiedenen anderen Zelltypen auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht. Danach wurde das intraepidermale Expressionsmuster der TLRs bei atopischem Ekzem, Psoriasis, Kontaktekzem sowie gesunder Haut mittels immunhistochemischer Methoden untersucht. Aussagen zum subzellulären Muster der Expression wurden mittels Immunfluoreszenz und anschließender konfokalen Laserscanmikroskopie gewonnen.

### 4.1 Konstitutive Expression von TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten auf mRNA- und Proteinebene

Die Untersuchungen wiesen eine konstitutive Expression von TLR2- und TLR4-mRNA in humanen Keratinozyten nach. Es zeigte sich eine Expression beider Proteine *in vitro* auf mRNA-Ebene in Zellkulturen primärer Keratinozyten, isolierter Epidermis und HaCaT-Zellen sowie *in vivo* auf Proteinebene in Hautpräparaten gesunder sowie erkrankter Haut. Hierzu wurde zunächst die mRNA von primären Keratinozyten, isolierter Epidermis und HaCaT-Zellen mittels Realtime-PCR sowie Gelelektrophorese untersucht. Da bei humanen Lymphozyten, humanen Monozyten sowie der humanen Monozyten Zelllinie THP-1 eine

konstitutive mRNA-Expression bekannt ist, dienten diese Immunzellen als Positivkontrollen. Die Expression von TLR2 wird in der Literatur als konstant beschrieben und steht mit unseren Ergebnissen im Einklang (Pivarsci et al. 2003).

Zur TLR4-Expression humaner Keratinozyten bestehen in der Literatur unterschiedliche Aussagen. Während einige Arbeitsgruppen die Expression von TLR4 in humanen Keratinozyten nicht nachweisen konnten (Köllisch et al. 2005; Mempel et al. 2003), wird diese von uns wie auch anderen Arbeitsgruppen aufgezeigt (Lebre et al. 2007; Begon et al. 2007; Pivarsci et al. 2003; Song et al. 2002).

Wie von Begon et al. vermutet könnten diese diskrepanten Ergebnisse auf die unterschiedliche Herkunft der gewonnenen Keratinozyten zurückzuführen sein (Keratinozyten von Hautproben aus plastisch-chirurgischen Eingriffen versus Keratinozyten aus neonataler Vorhaut). Darüber hinaus ließen einige Publikationen Aussagen hinsichtlich des Alters, des Geschlechts sowie über die Lokalisation der Entnahmestelle vermissen. Weiterhin fehlen Angaben darüber, ob es sich bei den untersuchten Proben um isolierte Epidermis oder um Vollhautpräparate handelt. Unterschiedliche Zellpopulationen könnten eine Erklärung der diskrepanten Ergebnisse sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf ein Studiendesign, welches möglichst gleiche Kriterien für alle entnommenen Proben einschließt, geachtet.

Während TLR2 der Erkennung multipler Bestandteile gram-positiver Bakterien, wie Lipoteichonsäure und Peptidoglycan dient (Takeuchi et al. 1999), ist der Hauptligand für TLR4 das Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien (Hoshino et al. 1999). In den immunhistochemischen Untersuchungen stellte sich die Expression von TLR4 im Vergleich zu TLR2 abgeschwächt dar. Die stärkere Expression von TLR2 verglichen mit TLR4 führten wir darauf zurück, dass der Hauptligand für TLR2 das Peptidoglycan gram-positiver Bakterien ist und die Haut überwiegend durch diese Gruppe von Bakterien besiedelt wird. Ferner kommt gram-positiven Bakterien bei Infektionen der Haut eine übergeordnete Rolle zu. Eine kontinuierliche Stimulation der residenten oder transienten und überwiegend gram-positiven Hautflora könnte daher zu einer verstärkten Expression von TLR2 im Vergleich zu TLR4 führen. Diese Ergebnisse verdeutlichen eine übergeordnete Rolle von TLR2 in der kutanen Abwehr gegenüber dem Lipopolysaccharid erkennendem TLR4. Für weitere Untersuchungen wäre es sinnvoll, mRNA-Proben von Psoriasis-, atopischer- und

Kontaktekzem-Haut zu gewinnen, um Erkenntnisse über etwaige Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene im Vergleich zu normaler Haut zu gewinnen.

## 4.2 Intraepidermale Lokalisation von TLR2 und TLR4

Um zu prüfen, ob es intraepidermale Unterschiede hinsichtlich der TLR-Expression bei pathologisch veränderter Haut im Vergleich zu gesunder Haut gibt, haben wir mittels Immunhistochemie sowohl das Expressionsmuster als auch die Färbeintensität beurteilt. Es ließen sich für TLR2 und TLR4 Unterschiede hinsichtlich des intraepidermalen Expressionsmusters zwischen gesunder und pathologisch veränderter Haut feststellen.

### 4.2.1 TLR2

Für TLR2 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in der gesamten kernhaltigen Epidermis sowohl bei gesunder Haut als auch bei den Präparaten erkrankter Haut exprimiert wird. Insgesamt erscheint die Färbeintensität im Sinne einer höheren Rezeptordichte verstärkt (siehe unten im Vergleich mit TLR4). Neben dem erhöhten Expressionsniveau von TLR2 stellte sich das subzelluläre Muster in Form einer zytoplasmatischen Akkumulation von dichtgepackten Rezeptorkonglomeraten dar.

Entgegengesetzt den bisherigen Meinungen einiger Autoren, die die Lokalisation von TLR2 bei gesunder Haut entweder als verstärkt in den suprabasalen (Pivarcsi et al. 2003) oder in den basalen Zellschichten (Curry et al. 2003; Begon et al. 2007) beschrieben, zeigte sich in unseren Untersuchungen eine intensive, jedoch homogene Immunreaktion in allen Zellschichten der Epidermis. Die Präparate von atopischen Ekzemen, Psoriasis und Kontaktekzemen hingegen zeigten eine verstärkte Expression im *Stratum basale* beziehungsweise im Bereich der dermo-epidermalen Junktionszone.

Die Beobachtung, dass es in pathologisch veränderter Haut zu einer verstärkten basalen Färbung kommt, könnte auf ein unterschiedliches Kern-Plasma-Verhältnis von basalen im Vergleich zu apikalen Schichten zurückzuführen sein. Während die Kerngröße von basal nach apikal abnimmt, nimmt der Anteil des Zytoplasmas zu (Moll 2005). Die Färbeintensität könnte insofern apikal insgesamt schwächer ausfallen, da die Zellen schlichtweg einen

höheren Zytoplasma Anteil besitzen. Diese Vermutung lässt sich jedoch nicht an den Präparaten gesunder Haut, welche für TLR2 gleichmäßig stark und für TLR4 ausschließlich basal gefärbt ist, widerspiegeln. Somit sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass es tatsächlich zu Expressionsunterschieden innerhalb der Epidermis kommt und diese nicht durch die unterschiedliche Morphologie der Keratinozyten bedingt ist.

Unsere Erklärung für diese Unterschiede war, dass es bei allen drei Krankheitsbildern zu einer gestörten Hautbarriere kommt. Durch einen Funktionsverlust des *Stratum corneum*, welches durch eng-vernetzte Proteine und Lipide eine physiologische Barriere der Haut darstellt (Proksch et al. 2009), könnte es zu einer permanenten, durch residente oder transiente Bakterien ausgelösten Überstimulation kommen, sofern die apikalen Zellschichten eine ähnlich hohe Rezeptordichte aufweisen würden, wie dies in gesunder Haut mit intaktem *Stratum corneum* der Fall ist.

Es wurde bereits gezeigt, dass es bei einer prolongierten Stimulation epithelialer Zellen mit PAMPs, zu einer verminderten apikalen Expression von TLR2 und TLR4 kommt (Rakoff-Nahoum et al. 2004; Cario et al. 2002; Abreu et al. 2003). Die Rezeptoren werden bei Überstimulation internalisiert, gelangen zu intrazellulären Kompartimenten wie dem Golgi-Apparat oder der basolateralen Membran, behalten jedoch ihre volle Funktionsfähigkeit (Furrie et al. 2005; Lee et al. 2008). Bei gesunder Haut mit intakten *Stratum corneum* findet diese konstante Stimulation in einem deutlich geringeren Maße statt, so dass es aus immunologischer Sicht nicht sinnvoll erscheint, die Rezeptoren der apikalen Schichten herunterzuregulieren.

Es lässt sich aufgrund dieser Erkenntnis vermuten, dass es nach Überstimulation nicht nur zu einer Internalisierung, sondern auch zu einem Abbau des Rezeptors in den apikalen Zellschichten insbesondere bei chronischen Hauterkrankungen, die mit einer gestörten Hautbarriere einhergehen, kommt. Die vermehrte Expression von TLR2 in den basalen Zellschichten könnte das Eindringen der Mikroben in die Dermis und damit einen systemischen Zugang verhindern. So könnte eine Internalisierung sowie ein „Rückzug“ der Rezeptoren in basale epidermale Bereiche als eine Art immunologischer Schutzmechanismus des Körpers vor einer überschießenden Dauerinflammation gedeutet werden.

Gegenstand der aktuellen Literatur ist überdies die Frage einer erhöhten TLR2-Expression bei Psoriasis, wie von Begon et al. beschrieben. Auch wenn eine erhöhte TLR2-Expression in Hinblick auf die kaum vorhandenen bakteriellen Superinfektionen bei der Psoriasis gut damit

vereinbar wäre, konnten wir diese Ergebnisse mittels immunhistologischer Methoden nicht bestätigen. Gründe für die in der Literatur beschriebene Hochregulation von TLR2 bei Psoriasis könnten die für die Psoriasis charakteristisch hohen Spiegel an TH1-assoziierten Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sein (Gudjonsson et al. 2004). Es wurde bei renalen Epithelzellen gezeigt, dass es nach Stimulation dieser beiden Zytokine zu einer Hochregulation von TLR2 und TLR4 kam (Wolfs et al. 2002). Ein weiterer Grund der für eine erhöhte TLR2-Expression sprechen könnte, ist eine bei Psoriasis erhöht festgestellte Expression von anti-Keratin-16-Antikörpern (Wu et al. 2008). Keratinozyten, welche mit Anti-Keratin-16-Antikörpern inkubiert wurden, zeigten eine erhöhte Expression von TLR2 und TLR4 (Wu et al. 2008). Ferner gibt es Hinweise für eine Überexpression von TLR bei gestörter Hautbarriere (Inoue et al. 2007).

Generell kann die Immunhistochemie, wie auch andere Methoden fehlerbehaftet sein. Färberesultate sind abhängig von der Spezifität des verwendeten Antikörpers, der Lokalisation der Probenentnahmestelle, der Art und Dauer der Vorbehandlungsmethode sowie von den Versuchsbedingungen. Um Fehlerquellen der eingesetzten Methoden im Vorfeld adäquat entgegenzuwirken, wurde die Methodenspezifität, also dass die Färbung ausschließlich auf Bindung des primären Antikörpers beruht, überprüft. In allen Negativkontrollen, sprich unter Auftragen von TBS Puffer anstelle des Primärantikörpers zeigte sich in unseren Versuchen stets eine negative Färbereaktion. Dies zeigt eine relativ hohe Methodenspezifität auf. Eine hohe Methodensensitivität, also dass minimale Mengen an Antigen nachgewiesen werden können, wurde durch Verwendung indirekter Färbemethoden gewährleistet. Indirekte Färbemethoden haben eine höhere Sensitivität, da mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden und somit eine Signalverstärkung erzeugen.

Anhand der von uns durchgeführten Untersuchungen lässt sich schließen, dass mithilfe der Immunhistochemie eine klare Unterscheidung zwischen gesunder und pathologisch veränderter Haut möglich ist, eine Unterscheidung innerhalb der entzündlichen Dermatosen von atopischem Ekzem, Psoriasis und Kontaktekzem hingegen nicht. Als klinisches Diagnosekriterium zur Unterscheidung der oben genannten Erkrankungen eignet sich die immunhistologische Färbung auf TLR daher nicht.

### 4.2.2 TLR4

Im direkten Vergleich mit TLR2 erscheint die Rezeptordichte für TLR4 verringert. Dies mag darin begründet sein, dass gram-negative Infektionen bei entzündlichen Dermatosen deutlich seltener vorkommen und die Expression somit schwächer ausfällt.

Im Gegensatz zu der TLR2-Expression in Präparaten von gesunder Haut zeigte sich für TLR4 in der immunhistochemischen Färbung eine verstärkte Immunreaktion in den basalen epidermalen Bereichen. Die Zellen im Bereich der dermo-epidermalen Junktionszone sind stark angefärbt und lassen sich hinsichtlich der Immunreaktion klar von den darüberliegenden Zellschichten unterscheiden. Hierbei kann es sich aufgrund der typischen Lokalisation in der Basalschicht auch um Melanozyten (Moll et al. 2005) oder um andere TLR4-exprimierende Zellen handeln.

Bei den Präparaten von erkrankter Haut zeigte sich eine homogene Immunreaktion mit verstärkter Färbung apikaler Zellschichten. Dieser immunologische „Shift“ von einer überwiegend basalen Färbung bei gesunder Haut zu einer vermehrten Immunreaktion apikaler Schichten bei pathologisch veränderter Haut könnte als Reaktion des Immunsystems auf eine gestörte Hautbarriere gedeutet werden. Somit könnte die apikale Expression von TLR4 in pathologisch veränderter Haut dafür verantwortlich sein, ein Eindringen von gram-negativen Bakterien gleich zu Beginn beziehungsweise bei Erstkontakt mit der Epidermis zu detektieren um einen systemischen Zugang welcher unter Umständen eine gram negative Sepsis auslösen könnte zu vermeiden.

Einige Studien zeigten, dass TLR4 nicht nur an der Erkennung bakterieller Zellwandbestandteile sowie *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* beteiligt ist (Netea et al. 2002; Meier et al. 2003), sondern auch in der Erkennung anorganischer Substanzen eine wichtige Rolle spielt (Schmidt et al. 2010). Schmidt et al. gelang es erstmals zu demonstrieren, dass TLR4 direkt durch Nickel stimuliert werden kann. Gerade beim Kontaktekzem ließe sich somit das apikale Muster darauf zurückführen, dass es in diesem Bereich zu einer Stimulation und somit zu einer erhöhten Rezeptordichte gekommen ist. Die Zieldomäne zur Detektion und die nachfolgend ablaufende Entzündungsreaktion unterscheidet sich jedoch von derer, welche für die Bindung von Lipopolysacchariden verantwortlich ist. Diese Erkenntnis könnte neue Therapieoptionen in Form von TLR4-Antagonisten bei dem durch Nickel induzierten allergischen Kontaktekzem eröffnen.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass nur humane TLR4 Rezeptoren, nicht aber solche aus der Maus, durch Nickel aktiviert werden (Schmidt et al. 2010). Da dem entsprechenden Maus Rezeptor die bindungsrelevanten Aminosäuren fehlen, ist das Mausmodell zur Untersuchung der TLR nur begrenzt geeignet (Schmidt et al. 2010). Dies könnte auch erklären, warum einigen Arbeitsgruppen kein Nachweis von TLR4 gelang. Desweiteren ließ sich feststellen, dass TLR4 hinsichtlich des subzellulären Musters weniger akkumuliert und eher homogen im Zytoplasma erscheint. Auch hieraus lässt sich schließen, dass TLR2 und TLR4 eine grundsätzlich unterschiedliche Rolle in der kutanen Abwehr zuzuordnen ist.

### **4.3 TLR2 und TLR4 werden intrazellulär exprimiert**

Wichtige Erkenntnisse über die Funktion von Proteinen können über die Identifizierung der subzellulären Lokalisation gewonnen werden. Da sich in der immunhistochemischen Färbung mittels DAB Hinweise auf eine intrazelluläre Expression von TLR2 und TLR4 ergaben, führten wir zur genaueren Überprüfung an allen Präparaten zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen durch. Höhere Auflösung sowie stärkerer Kontrastunterschied dieser Methode ermöglichen bessere Aussagen über das subzelluläre Muster.

Unsere Untersuchungen zeigen eine intrazelluläre Expression von TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten. Diese Beobachtung widerspricht der Datenlage einiger Autoren, welche TLR1, 2, 4, 5 und 6 als plasmamembranständig beziehungsweise TLR3, 7, 8 und 9 an intrazelluläre Komponenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum oder Endosomen gebunden beschreiben (Latz et al. 2004; Leifer et al. 2004; Matsumoto et al. 2003). Bezüglich der von uns insbesondere bei TLR2 beobachteten Akkumulation ließen sich in der aktuellen Literatur keine Aussagen finden. Ein Grund hierfür könnte die insbesondere für TLR2 charakteristische Ausbildung von Heterodimeren sein, welche möglicherweise ein anderes Fluoreszenzsignal liefert. Ein weiterer Grund für ein granuläres Muster könnte sein, dass die Proteine in Vesikeln am endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat dicht-verpackt sind und somit ein starkes Signal in der Immunfluoreszenz darstellen. Leifer et al. zeigte, dass TLR9 vor Stimulation mit CpG-Motiven, am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (Leifer et al. 2004).

Eine intrazelluläre Expression von TLR2 und TLR4 konnte auch bei undifferenzierten intestinalen Epithelzellen gezeigt werden und geht offensichtlich mit einer verminderten Immunantwort auf TLR-Liganden einher (Cario et al. 2002). Auch in den Epithelien der Lunge und des Gastrointestinaltraktes wurde eine intrazelluläre TLR-Expression beschrieben, die eine verminderte Reaktion auf PAMPs bewirkt. Infolgedessen würde eine intrazelluläre Expression von TLR2 und TLR4 in humanen Keratinozyten eine dauerhafte Überstimulation der Haut durch permanente Mikrobenbesiedlung verhindern.

Besonders bei einer gestörten Hautbarriere käme es bei einer stark membranösen Expression zu einer dauerhaften und inadäquaten Stimulation der TLRs durch die konstante Exposition zu verschiedenen PAMPs. Eine intrazelluläre Expression ermöglicht eine Funktionalitätserhöhung im Sinne einer erhöhten Spezifität durch bessere Erkennung von „fremd“ DNA bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber der körpereigenen DNA (Haas et al. 2008). Dies könnte sich insofern äußern, als dass TLR2 und TLR4 auch intrazellulär an einer Detektion ganz bestimmter Struktur motive beteiligt sein könnten und auch im intrazellulären Kompartiment eine gezielte Stimulation gegen spezifische, bisher nicht identifizierte PAMPs induzieren könnten.

Anderen Arbeitsgruppen gelang es bereits an intestinalen Epithelzellen nachzuweisen, dass die Rezeptoren nach einer Internalisierung weiterhin funktionsfähig bleiben und der Erkennung intrazellulärer Signale dienen (Furrie et al. 2005; Lee et al. 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Stimulation von Keratinozyten mit den TH1-Zytokinen INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nicht nur zu einer erhöhten intrazellulären Expression führt, sondern auch zu einer membranösen Translokation (Begon et al. 2007). TH1-Zytokine haben infolgedessen einen regulatorischen Einfluss auf eine membranöse beziehungsweise intrazelluläre Expression. Unsere Hypothese ist, dass die intrazellulären Rezeptoren eine Art Reserve darstellen, welche nach Stimulation durch PAMPs oder Zytokine mobilisiert werden können.

Sofern es sich um funktionsfähige Rezeptoren handelt, bleibt zu klären, ob ihnen intra- wie extrazellulär die gleichen Funktionen sowie die gleichen Liganden zuzuordnen sind. Weiterhin sollte geprüft werden, ob es für TLR2 und TLR4 bisher nicht identifizierte intrazelluläre Liganden gibt, wie es beispielsweise bei der intrazellulären Erkennung von CpG-Motiven für TLR9 gezeigt werden konnte (Leifer et al. 2004). Die Rezeptoren der angeborenen Immunität könnten also nicht nur durch PAMPs, sondern auch durch endogene Gefahrensignale, sogenannte DAMPs (danger-associated molecular patterns) einer



pathologisch veränderten Zelle aktiviert werden. Diese Gefahrensignale könnten durch eine Nekrose, also einen pathologischen Zelltod, oder aber auch durch ein Freisetzen von extrazellulären Matrixkomponenten im Rahmen einer Entzündungsreaktion erzeugt werden (Asea et al. 2002). Neuere Studien zeigten, dass beim Erkennen verschiedener PAMPs durch TLRs gleichzeitig die für die Wundheilung und Gewebsregeneration verantwortlichen Gene induziert werden (Kluwe et al. 2009).

Demzufolge könnte eine therapeutische Modulation der TLRs neue Perspektiven in Hinblick auf eine antiinflammatorische Wirkung bei chronischen Erkrankungen wie dem atopischen Ekzem und der Psoriasis bedeuten und unterstreicht die Rolle der TLR im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse.

Diese Erkenntnisse verschaffen neue Einblicke in die Funktions- und Aufgabenbereiche der TLRs und verdeutlichen, dass viele Zusammenhänge nicht vollständig geklärt sind. Es gelang uns nachzuweisen, dass TLR2 und TLR4 konstitutiv in Keratinozyten exprimiert werden und dass es bei chronischen Entzündungsreaktionen im Vergleich zu gesunder Haut zu einem veränderten intraepidermalen Muster kommt. Darüber hinaus konnte ein Nachweis über eine intrazelluläre Expression beider Rezeptoren erbracht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten sind jedoch nicht ausreichend, um Rückschlüsse auf die bei atopischem Ekzem bestehende hohe Rate an Superinfektionen ziehen zu können.

Es bleibt zu klären, ob es bei den untersuchten Krankheiten im Rahmen des TLR-Signalweges zum Beispiel durch Mutationen zu einer fehlgeleiteten Immunreaktion kommt. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungsergebnisse von Picard et al. interessant, die dem IRAK4, einem am TLR-Signalweg beteiligtem Molekül, Bedeutung bei der Abwehr von *Staphylococcus aureus* beimessen (Picard et al. 2003). So erhöhen Mutationen im IRAK4-Gen das Risiko für *Staphylococcus aureus* assoziierte Infektionen. Unsere Ergebnisse hinsichtlich der konstitutiven TLR4-Expression, der Identifizierung des intraepidermalen Musters sowie des Nachweises einer intrazellulären Expression eröffnen neue Erkenntnisse hinsichtlich weiterer Therapieoptionen. Gezielte Induktion oder selektive Inhibition verschiedener TLRs beziehungsweise der an den Signalwegen beteiligten Molekülen sind denkbare Interventionsmöglichkeiten.

## 5 Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind ein wichtiger Teil der angeborenen Immunität, da ihnen unter Anderem bei der Früherkennung mikrobieller Struktur motive eine entscheidende Rolle zukommt. So wird beispielsweise eine fehlgeleitete Aktivierung der Toll-like Rezeptoren mit verschiedenen Infektionskrankheiten sowie Wundheilungsstörungen der Haut assoziiert. Da bei atopischem Ekzem, anders als bei der Psoriasis, häufig eine bakterielle Superinfektion vorliegt, wird spekuliert, ob ein Defizit in der Expression bestimmter Toll-like Rezeptoren als Grund hierfür in Betracht kommt. Ziel unserer Arbeit war es, Expression, schichtspezifische und subzelluläre Lokalisation von Toll-like Rezeptor 2 und 4 in humanen Keratinozyten *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen. Hierzu wurde die Expression der Toll-like Rezeptoren in Keratinozyten mittels Realtime-PCR auf mRNA-Ebene und immunhistochemisch auf Proteinebene untersucht. Es gelang uns, beide Rezeptoren in humanen Keratinozyten *in vitro* nachzuweisen und zudem *in vivo* die unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb der Epidermis aufzuzeigen. In gesunder Haut wurde Toll-like Rezeptor 2 in der gesamten kernhaltigen Epidermis nachgewiesen. Das *Stratum corneum* war in einem Viertel der Präparate geringgradig mit angefärbt. Für Toll-like Rezeptor 4 zeigte sich dagegen eine scharf begrenzte basale Expression. Das Anfärbemuster änderte sich in erkrankter Haut: Toll-like Rezeptor 2 war bei atopischem Ekzem, Psoriasis und Kontaktekzem primär basal exprimiert, während sich Toll-like Rezeptor 4 apikal verstärkt nachweisen ließ. Hieraus lässt sich schließen, dass beiden Rezeptoren sowohl in erkrankter, entzündlicher und barrieregestörter Haut, als auch in gesunder Haut unterschiedliche Aufgaben zuzuordnen sind. Wir vermuten daher, dass Toll-like Rezeptor 4 aufgrund der apikalen Lokalisation primär in der Abwehr von Mikroorganismen involviert ist, die potentiell bei gestörter Barriere vermehrt in die Haut eindringen können. Die von uns zu Beginn der Arbeit aus Gründen der hohen Infektionsrate bei atopischem Ekzem vermutete quantitativ erniedrigte Toll-like Rezeptor-Expression ließ sich allerdings nicht feststellen. Um Aussagen über das subzelluläre Muster von Toll-like Rezeptor 2 und 4 treffen zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt und diese anschließend mittels konfokaler Laserscanmikroskopie ausgewertet. Es gelang uns damit, neben der beschriebenen membranösen Expression eine intrazelluläre Expression beider Rezeptoren aufzuzeigen. Beide Rezeptoren unterscheiden sich hinsichtlich ihres

subzellulären Musters. Während sich Toll-like Rezeptor 2 in Form von dicht gepackten Rezeptorkonglomeraten darstellte, zeigte Toll-like Rezeptor 4 ein eher homogenes und weniger granuläres Muster. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Expression von Toll-like Rezeptor 2 und 4 bei entzündlichen Hauterkrankungen ergeben Hinweise zur Pathogenese dieser Erkrankungen sowie zur Entwicklung neuer Therapiestrategien.

## 6 Literaturverzeichnis

Abreu, M.T., Thomas, L.S., Arnold, E.T., Lukasek, K., Michelsen, K.S., Arditi, M. (2003): TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J Endotoxin Res*, 9:322-30

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

Andersen, K.E. (2003): Occupational issues of allergic contact dermatitis. *Int Arch Occup Environ Health*, 76: 347-50

Akira, S. (2003): Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*; 278:38105-8

Akira, S., Hemmi, H. (2003): Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*, 85:85-95

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 4. *JBiol Chem*, 277:15028-34

Begon, E., Michel, L., Flageul, B., Beaudoin, I., Jean-Louis F, Bachelez H., Dubertret, L., Musette, P. (2007): Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol*, 17:497-506

Bochud, P.Y., Hawn, T.R., Aderem, A., (2003): Cutting edge: a toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol*, 170:3451-4

Cario, E., Brown, D., McKee, M., Lynch-Devaney, K., Gerken, G., Podolsky, D.K. (2002): Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol*, 160(1):165-73

Chew, A.L., Maibach, H.I. (2003): Occupational issues of irritant contact dermatitis. *Int Arch Occup Environ Health*, 76:339-46

Christophers, E., Henseler, T. (1987): Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*, 279:48-51

Coca, A.F., Cooke, R.A. (1923): On the classification of the phenomenon of the hypersensitivity. *J. Immunol*, 8:162-182

Curry, J.L., Qin, J.Z., Bonish, B., Carrick, R., Bacon, P., Panella, J., Robinson, J., Nickoloff, B.J. (2003): Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch Pathol Lab Med*, 127:178-86

Denda, M. (2009): Methodology to improve epidermal barrier homeostasis: how to accelerate the barrier recovery. *Int J Cosmet Sci*, 31:79-86

English, J.S. (2004): Current concepts of irritant contact dermatitis. *Occup Environ Med*, 61:722–6

Farber, E.M., Nall, M.L. (1974): The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica*, 148:1-18

Fölster-Holst, R., Moises, H.W., Yang, L., Fritsch, W., Weissenbach, J., Christophers, E. (1998): Linkage between atopy and the IgE high-affinity receptor gene at 11q13 in atopic dermatitis families. *Hum Gene*, 102:236–239

Fölster-Holst, R., Pape, M., Buss, Y.L., Christophers, E., Weichenthal, M. (2006): Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients. *Allergy*, 61:629-632

Fölster-Holst, R., Proksch, E., Weißmantel, S., Schwarz, T. (2011): *Atopisches Ekzem-Grundlagen und Updates*, Hrsg. Fölster-Holst, R., Schwarz, T., UNI-MED Verlag, 1.Auflage 2011;12-43

Freudenberg, M.A., Esser, P.R., Jakob, T., Galanos, C., Martin, S.F. (2009): Innate and adaptive immune responses in contact dermatitis: analogy with infections. *G. Ital. Dermatol. Venereol*, 144:173–185

Furrie, E., Macfarlane, S., Thomson, G., Macfarlane, G.T. (2005): Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, 115:565-74

Gläser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J.M., Schwarz, T. (2009): The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J Invest Dermatol*, 129:641–9

Gudjonsson, J.E., Johnston, A., Sigmundsdottir, H., Valdimarsson, H. (2004): Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol*, 135(1):1-8

Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Muller, T., Latz, E., Wagner, H. (2008): The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*, 28(3):315-23

Hallman, M., Ramet, M., Ezekowitz, R.A. (2001): Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res*, 50:315-21

Hamid, Q., Boguniewicz, M., Leung, D.Y. (1994): Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest*, 94:870-6

Harder, J., Schröder, J.M. (2005): Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol*, 77:476–86

Henseler, T., Christophers, E., (1985): Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 13:450-6

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162:3749

Inoue, J., Aramaki, Y. (2007): Toll-like receptor-9 expression induced by tape-stripping triggers on effective immune response with CpG-oligodeoxynucleotides. *Vaccine*, 25(6):1007-13

Iwasaki, A., Medzhitov, R. (2004): Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 5:987–995

Kang, T.J., Lee, Chae, G.T., (2002): A polymorphism in toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocytes in lepromatous leprosy. *Cytokine*, 20:56-62

Kawai, T., Akira, S. (2007): TLR signaling. *Semin Immunol*, 19(1):24–32

Kimber, I., Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Dearman, R.J. (2002): Allergic contact dermatitis. *International Immunopharmacology*, 2:201–11

Kluwe, J., Mencin. A., Schwabe, R.F.(2009). Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J Mol Med*, 87:125–138

Köllisch, G., Kalali, B.N., Völcker, V., Wallich, R., Behrendt, H., Ring, J., et al. (2005): Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, 114:531–541

Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien E., Nilsen, N.J., Espevik, T., Golenbock, D.T. (2004): TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol*, 5:190–198

Lebre, M.C., van der Aar, A.M., van Baarsen, L., van Capel, T.M., Schuitemaker, J.H., Kapsenberg, M.L. (2007): Human Keratinocytes Express Functional Toll-Like Receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*, 127(2):331-41

Lee, J., Gonzales-Navajas, J.M., Raz, E. (2008) The “polarizing-tolerizing” mechanism of intestinal epithelium: its relevance to colonic homeostasis. *Semin Immunopathol*, 30:3-9

Lee, S.H., Jeong, S.K., Ahn, S.K. (2006): An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J*, 47(3):293-306

Leifer, C.A., Kennedy, M.N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M.J., Segal, D.M. (2004): TLR 9 is localized in the endoplasmatic reticulum prior stimulation. *J. Immunol*, 173:1179–1183

Leung, D.Y. (2003):, Infection in atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr*, 15:399-404

Leung, D.Y., Bieber, T. (2003): Atopic dermatitis. *Lancet*, 361(9352):151-60

Martin, S.F., Dudda, J.C., Bachtanian, E., Lembo, A., Liller, S., Dürr, C., Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Fejer, G., Vassileva, R., Jakob, T., Freudenberg, N., Termeer, C.C., Johner, C., Galanos, C., Freudenberg, M.A. (2008); Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med*, 205:2151–2162

Matsumoto. M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., Seya, T. (2003): Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol*, 171:3154–3162

McGirt, L.Y., Beck, L.A. (2006): Innate immune defects in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 118(1):202-8



- Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1:135–145
- Medzhitov, R., Janeway, C. Jr. (2000): Innate immunity. *N Engl J Med*, 343:338–344
- Meier, A., Kirschning, C.J., Nikolaus, T., Wagner, H., Heesemann, J., Ebel, F. (2003): Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol*, 5(8):561-70
- Mempel, M., Völcker, V., Köllisch, G., Plank, C., Rad, R., Gerhard, M., Schnopp, C., Fraunberger, P., Walli, A.K., Ring, J., Abeck, D., Ollert, M. (2003): Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J Invest Dermatol*, 121(6):1389-96
- Miller, L.S., Modlin R.L. (2007): Toll-like receptors in the skin. *Semin Immunopathol*; 29(1):1526
- Miller, L.S., Sorensen, O.E., Liu, P.T., Jalian, H.R., Eshtiaghpour, D., Behmanesh, B.E., Chung, W., Starner, T.D., Kim, J., Sieling, P.A., Ganz, T., Modlin, R.L. (2005): TGF-alpha regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol* 174(10):6137–6143
- Miyake, K. (2007): Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol*, 19:3-10
- Mogensen, T.H., Paludan, S.R., Kilian, M., Ostergaard, L. (2006): Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol*, 80(2):267-77
- Moll, I. (2005): *Dermatologie*. Hrsg. Jung, E.G., Thieme, Stuttgart; 6.Auflage

Mrowietz, U., Reich, K. (2009): Psoriasis-new insights into pathogenesis and treatment *Dtsch Arztebl Int.*, 106(1-2):11–19

Netea, M.G., Van Der Graaf, C.A., Vonk, A.G., Verschueren, I., Van Der Meer, J.W., Kullberg, B.J. (2002): The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis.*, 185(10):1483-9

Niebuhr, M., Lutat, C., Sigel, S., Werfel, T. (2009): Impaired TLR-2 expression and TLR-2-mediated cytokine secretion in macrophages from patients with atopic dermatitis. *Allergy*, 64(11):1580-7

Nomura, I., Goleva, E., Howell, M.D., Hamid, Q.A., Ong, P.Y., Hall, C.F., Darst, M.A., Gao, B., Boguniewicz, M., Travers, J.B., Leung, D.Y. (2003): Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol*, 171:3262–3269

Ong, P.Y., Ohtakem T., Brandtm C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L., Leung, D.Y. (2002): Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med*, 347:1151–1160

Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C.L., Bustamante, J., Yang, K., Soudais, C., Dupuis, S., Feinberg, J., Fieschi, C., Elbim, C., Hitchcock, R., Lammas, D., Davies, G., Al-Ghonaïum, A., Al-Rayes, H., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Al-Mohsen, I.Z., Frayha, H.H., Rucker, R., Hawn, T.R., Aderem, A., Tufenkeji, H., Haraguchi, S., Day, N.K., Good, R.A., Gougerot-Pocidalò, M.A., Ozinsky, A., Casanova, J. (2003): Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science*, 299:2076-9

Pivarsci, A., Bodai, L., Rethi, B., Kenderessy-Szabo, A., Koreck, A., Szell, M., Beer, Z., Bata-Csörgö, Z., Magócsi, M., Rajnavölgyi, E., Dobozy, A., Kemény, L. (2003): Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol*, 5(6):721-30

Proksch, E., Fölster-Holst, R., Bräutigam, M., Sephermanesh, M., Pfeiffer, S., Jensen, J.M. (2009): Role of epidermal barrier in atopic dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges*, 7:899-910

Proksch, E., Holleran, W.M., Menon, G.K., Elias, P.M., Feingold, K.R. (1993): Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis. *Br J Dermatol.*, 128(5):473-82

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. (2004): Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118:229-41

Remmele, W., Stegner, H.E. (1987): Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*. 8(3):138-40

Rieg, S., Steffen, H., Seeber, S., Humeny, A., Kalbacher, H., Dietz, K., Garbe, C., Schitteck, B. (2005): Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. *J Immunol*, 174(12):8003–8010

Roll, A., Cozzio, A., Fischer, B., Schmid-Grendelmeier, P. (2004): Microbial colonization and atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 4(5):373-8

Schmid-Grendelmeier, P., Simon, D., Simon, H.U. Akdis, C.A., Wüthrich, B. (2001): Epidemiology, clinical features, and immunology of the „intrinsic“(non IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy*, 56:841-849

Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P.J., Galanos, C., Roth, J., Skerra, A., Martin, S.F., Freudenberg, M.A., Goebeler M. (2010): Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol*, 11(9):814-9

Slodownik, D., Nixon, R. (2007) Occupational factors in skin diseases. *Curr Probl Dermatol*, 35, 173–89

Song, P.I., Park, Y.M., Abraham, T., Harten, B., Zivony, A., Neparidze, N., Armstrong, C.A., Ansel, J.C. (2002) : Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol*, 119(2):424-32

Su, S.B., Silver, P.B., Grajewski, R.S., Agarwal, R.K., Tang, J., Chan, C.C., Caspi, R.R. (2005): Essential role of the MyD88 pathway, but nonessential roles of TLRs 2, 4, and 9, in the adjuvant effect promoting Th1-mediated autoimmunity. *J Immunol*, 175(10):6303-10

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999): Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram- negative and Grampositive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11:443

Turvey, S.E., Hawn, T.R. (2006) Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections. *Clin Immunol*, 120:1-9

Wanke, I., Steffen, H., Christ, C., Krismer, B., Gotz, F., Peschel, A. (2010): Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol*, 131:382–390

Weidinger, S., Novak, N., Klopp, N., Baurecht, H., Wagenpfeil, S., Rummel, L., Ring, J., Behrendt, H., 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(1):277–279

Wolfs, T.G., Buurman, W.A., van Schadewijk, A., de Vries, B., Daemen, M.A., Hiemstra, P.S. (2002) In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*, 168(3):1286-93

Wu, C., Li, C., Wei, L., Zheng, L. (2008): Innate immune modulation of keratinocytes by antikeratin 16 antibodies. *Exp Dermatol*, 17:645–652

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*, 168:554-61

## 7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schwarz, dem Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit an seiner Klinik bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Regina Fölster-Holst und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Erhardt Proksch für die Vergabe des Themas sowie für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Rüdiger Panzer danke ich für die gute Zusammenarbeit und die konstante Unterstützung in der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Claudia Neumann, Frau Graziella Podda sowie bei Herrn Dr. rer. nat. Felix Scholz für die aufgebrachte Geduld und die Hilfe bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung und das stets in mich aufgebrachte Vertrauen bedanken.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Conrad Claudius Blobel
Geburtsdatum	03.06.1982
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Bildungsweg

04/2007- 05/2011	Klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10/2004 - 03/2007	Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen
01/2004 - 06/2004	Wissenschaftliches Praktikum im Laboratorium für molekulare Zellbiologie an der Rockefeller University in New York (USA)
07/2003 - 12/2003	Betriebswirtschaftliches Praktikum bei der Wappen-Reederei GmbH & Co. KG in Hamburg
07/2002 - 06/2003	Zivildienstleistender im Krankenhaus Großhansdorf – Zentrum für Thoraxchirurgie und Pneumologie GmbH - als Helfer der OP und Anästhesie Abteilung
1993 - 2002	Gymnasium im Schulzentrum am Heimgarten in Ahrensburg

### Praktische Erfahrung

10/2010 - 01/2011	Praktisches Jahr an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
06/2010 - 10/2010	Praktisches Jahr: Schwerpunkt Innere Medizin Städtisches Krankenhaus, Kiel
04/2010 - 06/2010	Praktisches Jahr: Schwerpunkt Chirurgie Mount Sinai School of Medicine in New York (USA)
02/2010 - 04/2010	Praktisches Jahr: Schwerpunkt Chirurgie Shanghai East Hospital, Universitätsklinikum der Tongji Universität in Shanghai (China)