
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

**Regulation der TLR 1, 2, 5, 6-mRNS-Expression in
humanen Keratinozyten durch das Interferon γ**

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

vorgelegt von
Alla Ljulkina
aus Arosavl

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Proksch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Herdegen
Tag der mündlichen Prüfung: 19. Januar 2016
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 19. Januar 2016

gez.: Prof. Dr. Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Materialien und Methoden	10
2.1 Vorbereitung der Zellkultur.....	10
2.1.1 Präparation und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten.....	10
2.1.2 Kollagenisieren der Zellkulturplatten.....	10
2.1.3 Passagieren der primären Keratinozyten.....	10
2.2 Durchführung der Experimente.....	11
2.2.1 Stimulation der Zellkultur mit ausgewählten Zytokinen.....	11
2.2.2 Stimulation der Zellkultur mit humanem Interferon γ	11
2.3 RNS-Isolierung.....	12
2.3.1 RNS-Isolierung mithilfe des NucleoSpin®-RNSII-Kits.....	12
2.3.2 RNS-Konzentrationsmessung.....	12
2.4 Reverse Transkription.....	12
2.5 Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR).....	13
2.6 Gelelektrophorese.....	14
2.7 Statistik.....	14
2.8 Verwendete Substanzen.....	15
3 Ergebnisse	17
3.1 Testung der humanen TLR 1-,2-,5-,6- und GAPDH-Primer.....	17
3.2 Testung der stimulatorischen Aktivität des Lösungspuffers von Interferon γ	18
3.3 Expression der hTLR2-mRNS nach Stimulation von humanen primären Keratinozyten mit verschiedenen Zytokinen.....	19
3.4 Expression der hTLR2-mRNS nach Stimulation von humanen primären Keratinozyten mit Interferon γ	21
3.4.1 hTLR2-mRNS-Expression bei einer IFN γ -Konzentration von 5 ng/ml.....	21
3.4.2 hTLR2-mRNS-Expression bei einer IFN γ -Konzentration von 10, 20, 30 ng/ml.....	22
3.4.3 hTLR2-mRNS-Expression bei einer IFN γ -Konzentration von 30, 40, 50 ng/ml.....	23
3.5 Expression der hTLR1-, hTLR5-, hTLR6-mRNS nach Stimulation von humanen primären Keratinozyten mit verschiedenen Zytokinen.....	25
3.6 Expression der hTLR1-, hTLR5-, hTLR6-mRNS nach Stimulation von humanen primären Keratinozyten mit verschiedenen Konzentrationen von Interferon γ	31

Inhaltsverzeichnis

3.6.1 Expression der hTLR1-mRNS nach 24h-Stimulation mit Interferon γ	31
3.6.2 Expression der hTLR5-mRNS nach 24h-Stimulation mit Interferon γ	34
3.6.3 Expression der hTLR6-mRNS nach 24h-Stimulation mit Interferon γ	38
3.7 Zeitkinetik.....	41
3.7.1 hTLR2-mRNS-Expression nach 8h und 16h-Stimulation von primären humanen Keratinocyten mit Interferon γ	42
3.7.2 hTLR1-mRNS-Expression nach 8h und 16h-Stimulation von primären humanen Keratinocyten mit Interferon γ	44
3.7.3 hTLR5-mRNS-Expression nach 8h und 16h-Stimulation von primären humanen Keratinocyten mit Interferon γ	45
3.7.4 hTLR6-mRNS-Expression nach 8h und 16h-Stimulation von primären humanen Keratinocyten mit Interferon γ	47
4 Diskussion.....	50
5 Zusammenfassung.....	61
6 Abkürzungsverzeichnis.....	63
7 Literaturverzeichnis.....	64
8 Danksagung.....	70
9 Lebenslauf.....	71

1 Einleitung

Die Haut hat eine Gesamtfläche von 1,5 bis 2 m² und ist ca. 3 bis 10 kg schwer, somit zählt sie zu den größten Organen des menschlichen Körpers. Sie ist zusammengesetzt aus 3 Schichten: Die oberste Schicht ist die Epidermis, die aus mehrschichtigem verhornenden Plattenepithel besteht, das hauptsächlich aus Keratinozyten gebildet wird. Darunter befindet sich die Dermis, die überwiegend aus Bindegewebe besteht. Als letzte Schicht schließt sich die aus Bindegewebe und Fettzellen bestehende Subkutis an.

Die Haut verfügt über viele bedeutungsvolle Funktionen: Passiv schützt sie vor Kälte, Hitze, UV-Strahlung, dient der Thermoregulation und eine ihrer wichtigsten Aufgaben ist, dass die Haut als immunologische Barriere fungiert (Sterry W. 2011). Die immunologische Barriere ist notwendig zur Abwehr eingedrungener Keime und Allergene.

Das Immunsystem gliedert sich in 2 Bestandteile: das angeborene (unspezifische) und das erworbene (spezifische, adaptive) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem wird rasch, innerhalb von Stunden, vor dem erworbenen Immunsystem nach Eindringen von Pathogenen aktiviert und löst in der Haut Reaktionen aus, die zur Phagozytose und zum Abtöten von Pathogenen durch Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen führt (Pivarcsi et al. 2003). Gleichzeitig wird die Produktion von Zytokinen und Chemokinen gestartet, die eine Aktivierung von T-Lymphozyten und somit des adaptiven Immunsystems bewirken, dabei werden durch die Zusammenarbeit von T- und B-Lymphozyten spezifisch die Erreger durch Antikörper inaktiviert und Gedächtniszellen gebildet (Pivarcsi et al. 2003; Sterry W. 2011). Beide Systeme sind über komplexe Mechanismen aneinandergeschlossen und unterstützen sich gegenseitig bei Abwehrreaktionen. Die Haut bildet somit eine erste „Verteidigungslinie“ für Substanzen, die von außen auf den Körper eindringen (Sterry W. 2011) und die Keratinozyten in der Epidermis spielen eine entscheidende Rolle sowohl als physikalische als auch immunologische Barriere, da die Keratinozyten durch entsprechende Rezeptoren pathogene Erreger erkennen und durch die Ausschüttung von Zytokinen zum Beispiel neutrophile Granulozyten anlocken können. Die kontinuierliche Ausreifung der Keratinozyten stellt somit eine intakte Barrierefunktion sicher (Pivarcsi et al. 2003).

Heutzutage weiß man, welche bedeutungsvolle zielgerichtete Komponente die angeborene Immunität besitzt: diese richtet sich gegen molekulare Muster von Mikroorganismen, die pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) genannt werden. Diese PAMPs werden

durch so genannte Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) erkannt (Krishna et al. 2012, Lebre et al. 2007, Begon et al. 2007). Zu diesen PRRs gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die essenziell sind für die Erkennung von mikrobiellen Mustern und für das Einleiten einer Immunantwort der Hautzellen. TLR werden von vielen verschiedenen Zelltypen in der Haut exprimiert, auch von Keratinozyten und Langerhanszellen (Miller et al. 2008). Im menschlichen Organismus sind bisher elf TLR identifiziert worden (TLR 1 bis 11) (Hedayat et al. 2012). Humane Keratinozyten exprimieren konstitutiv den TLR 1, 2, 3, 5 und 9 (Mempel et al. 2003), bei anderen Autoren werden auch TLR 4 und 6 angegeben (Lebre et al. 2007).

TLR sind Transmembranproteine, die entweder in der Zytoplasmamembran (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10) oder in intrazellulären Komponenten (TLR 3, 7, 8, 9), wie im endoplasmatischen Retikulum oder im Endosom, lokalisiert sind. Die Rezeptoren besitzen sowohl eine extrazelluläre als auch eine intrazelluläre Bindungsstelle. Die extrazelluläre Bindungsstelle bindet die Liganden und die intrazelluläre setzt eine Signalkaskade in Gang, die über die Bindung von Adapterproteinen, unter anderem MyD88, zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Dadurch wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen stimuliert (Lai et al. 2008). Jeder TLR erkennt bestimmte, individuelle PAMPs. TLR 2 wird auf einer großen Anzahl von Zellen exprimiert, wie Keratinozyten, Langerhanszellen, Monozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen, Fibroblasten und Adipozyten (Miller et al. 2008). TLR 2 als Homodimer (Terhorst et al. 2010) erkennt folgende Liganden: Lipoproteine, Lipoteichonsäure und Peptidoglykan von grampositiven Bakterien, Lipoarabinomannan von Mykobakterien, Glykoinositolphospholipide von *Trypanosoma cruzi*, phenollösliches Modulin von *Staphylococcus epidermidis* und Zymosan von Pilzen (Lai et al. 2008). Mit TLR 1 oder 6 bildet der TLR 2 Heterodimere: TLR 2/1 erkennt Triacyllipopeptide, TLR 2/6 Diaacyllipopeptide von Mykoplasmen, Zymosan von Pilzen und löslichen Tuberkulosefaktor (Lai et al. 2008), auch Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus*, da diese zu den Diaacyllipopeptiden gezählt wird. Wobei dann als Corezeptoren CD14 oder CD36 dienen, um eine Genexpression im Zellkern hervorzurufen und die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden zu veranlassen (Krishna et al. 2012). TLR 3 erkennt doppelsträngige Virus-RNS, TLR 4 Lipopolysaccharide von gramnegativen Bakterien. TLR 5 benötigt als Liganden bakterielles Flagellin, das sich unter anderem auf Bakterien wie *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*,

Pseudomonas aeruginosa, *Bacillus subtilis* und *Salmonella typhimurium* (Hayashi et al. 2001) befindet; die ersten drei genannten Bakterien spielen auf der Haut als Infektionserreger eine Rolle, da Listerien für primäre Hautinfekte, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* für sekundäre Wundinfekte verantwortlich sind. Neben dem TLR 5-Homodimer wurde auch das Heterodimer TLR 4/5 gefunden (Terhorst et al. 2010), dessen Funktion allerdings noch unbekannt ist. TLR 7 und 8 erkennt einzelsträngige Viren-RNS und TLR 9 pathogentypische hypomethylierte DNA an unmethylierten CpG (Cytosin-Phosphat-Guanin) Motiven (Kawai et al. 2002, Miller et al. 2008). Der Ligand für TLR 10 konnte noch nicht vollständig identifiziert werden (Lebre et al. 2007) und TLR 11 erkennt Proteine von *Toxoplasma gondii* und noch nicht identifizierte Liganden von uropathogenen Bakterien (Lai et al. 2008).

Daneben gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass die TLR außer Liganden von pathogenen Organismen auch körpereigene, endogene Liganden erkennen. Dies wird im Rahmen des so genannten „Danger model“ so interpretiert, dass die TLR-exprimierenden Zellen von den als Alarmsignal dienenden endogenen Liganden aktiviert werden, wenn eigene Zellen in Gefahr oder verletzt sind (Matzinger 2002). Dabei ist es wichtig, dass diese „Danger“-Signale nicht von gesunden körpereigenen Zellen oder von Zellen, die physiologisch durch Apoptose zugrunde gehen, ausgehen, sondern aus durch Verletzung freigesetzten intrazellulären und extrazellulären Bestandteilen bestehen (Matzinger 2002). Zu den endogenen Liganden der TLR zählen unter anderem folgende: TLR 2 kann als endogene Liganden das Hitzeschockprotein 70 erkennen und TLR 3 die mRNS. TLR 4 erkennt das Hitzeschockprotein 60, Fibrinogen, Fibronectin, Oligosaccharide von Hyaluronsäure und TLR 9 Chromatinimmunkomplexe (Lai et al. 2008).

Die TLR-Aktivierung führt nicht nur zur Zytokinproduktion im angeborenen Immunsystem, sondern stellt auch eine Verbindung zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität dar (Lai et al. 2008). Die Verbindung kommt durch die dendritischen Zellen zustande, die die Antigene nur dann den T-Lymphozyten präsentieren können, wenn sie über TLR-Signale aktiviert wurden. Der Unterschied zu den hochspezifischen Antigenrezeptoren der B- und T-Zellen ist der, dass die TLR „nur“ erkennen, dass es sich z.B. um ein gramnegatives oder begeißeltes Bakterium handelt, aber nicht zwischen verschiedenen gramnegativen Bakterien unterscheiden können. Eine weitere Verbindung zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität besteht darin, dass die TLR auch von T- und B-Lymphozyten exprimiert werden,

somit wird die Reaktion der Zellen des erworbenen Immunsystems auch über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems direkt beeinflusst (Kabelitz 2012).

Wie oben bereits erwähnt, sind Keratinozyten, neben dendritischen Zellen oder Makrophagen für eine funktionierende Hautbarriere verantwortlich. Eine gestörte Hautbarriere ist mit einem erhöhten Risiko für Hautinfektionen verbunden. Hierzu zählen z. B. Ekzemerkrankungen. So sind Patienten mit Neurodermitis, bei der Veränderungen in bestimmten Strukturproteinen, aber auch Umweltfaktoren zur Hautschädigung führen, besonders häufig von einer bakteriellen (vor allem mit *Staphylococcus aureus*), viralen (besonders Herpes simplex und *Mollusca contagiosum*) und mykologischen Besiedlung (Breuer et al. 2006) betroffen, die wiederum zu entzündlichen Hautreaktionen führt. Einige Autoren berichten, dass im Vergleich zur Psoriasis die geringe Expressionssteigerung der antimikrobiellen Peptide in neurodermitischer Haut die Infektionsgefahr erhöht (Nomura et al. 2003). Im Vergleich zur gesunden Haut ließ sich allerdings durchaus eine Induktion antimikrobieller Peptide nachweisen (Harder, Gläser et al. 2010). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Psoriasis, die ebenfalls mit einer Barrierestörung einhergeht, eine geringere Infektionsneigung zeigt (Christophers et al. 1987). Dies wird zumindest zum Teil dadurch erklärt, dass psoriatische Haut mehr antimikrobielle Peptide enthält (Harder, Schröder et al. 1997). Bei der Psoriasis handelt es sich möglicherweise um eine T-zellvermittelte Hauterkrankung (Sabat et al. 2007, Christophers 1987) mit einer gestörten Hautbarriere, bei der ebenfalls äußerliche Auslösefaktoren, wie systemische Infekte (insbesondere die Tonsillitis) oder Medikamente, eine Rolle spielen. Dabei ist eine Untergruppe der T-Zellen von besonderer Bedeutung, die Th1-Zellen (Krueger et al. 2005, Sabat et al. 2007), die durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden. Die Th1-Zellen beeinflussen durch Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren die Funktion der Keratinozyten und sorgen normalerweise für die Ausbildung einer zellulären Immunantwort. Proinflammatorische Mediatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ), die von Th1-Zellen sezerniert werden (Owen M.J., Lamb J.R. 1991: Immunerkennung, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; Ong et al. 2002; Gudjonsson et al. 2004), Interleukin (IL) 6 und 17, die vor allem von Th17-Zellen produziert werden (Brandt et al. 2011), und weitere Zytokine u.a. IL-1 β , -15, -18, -20 und Transforming growth factor α (TGF- α) nehmen eine bedeutende Rolle vor allem bei der Psoriasis ein und beeinflussen die biologischen Vorgänge in den Hautzellen. Infolgedessen werden weitere Entzündungszellen durch vermehrte Zytokinproduktion angelockt, wodurch eine Entzündungsreaktion gestartet

wird und zudem eine Hyperproliferation der Keratinozyten vorangetrieben wird (Krueger et al. 2005). Zusätzlich entsteht eine Differenzierungsstörung der Keratinozyten, dadurch kann die Barrierefunktion nicht aufrecht erhalten werden. Das Zytokin TNF- α (ein 17-kDa Protein) wird in der Epidermis vor allem von Keratinozyten und Langerhanszellen exprimiert und kann an 2 Rezeptoren, dem TNF-R1 (55 kDa)- und TNF-R2 (75 kDa)-Rezeptor, andocken, dadurch werden z.B. weitere Immunzellen, wie Neutrophile oder Langerhanszellen, angelockt (Shirakata et al. 2010). Humane Keratinozyten besitzen keinen TNF-R2, somit hängt die TNF- α -Wirkung von der TNF-R1-Expression ab (Tüzün et al. 2007). Die Ausschüttung von TNF- α wird verstärkt durch IFN- γ und IL-1 α (Uchi et al. 2000). TNF- α spielt nicht nur eine Rolle bei der Immunzellregulation, sondern kontrolliert auch die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose, vor allem von Makrophagen und dendritischen Zellen (Tüzün et al. 2007). Es ist beschrieben, dass TNF- α -Spiegel im Serum und in durch Saugwirkung hervorgerufenen Hautblasen mit der Schwere der Psoriasis korrelieren (Hänel et al. 2013) und man kann in erhöhten Mengen TNF- α nach einer induzierten Barriestörung in der Epidermis messen (Hänel et al. 2013). Außerdem wurde eine Überexpression von TNF- α bei Psoriasis nachgewiesen (Reich et al. 2002). Auf die besondere Stellung des Zytokins bei der Psoriasis deutet der erfolgreiche Einsatz von TNF- α -Blockern in der Psoriasisbehandlung hin (Hänel et al. 2013). Am inflammatorischen Vorgang bei der Psoriasis ist auch das IL-1 β beteiligt: es wird in psoriatischen Läsionen überexprimiert. Auch wird über Polymorphismen bei IL-1 β in mononuklearen Zellen spekuliert, die Einfluss auf die Infektionsanfälligkeit bei der Psoriasis nehmen könnten (Reich et al. 2002). Ebenfalls konnte eine Überexpression des Transforming growth factor α (TGF- α) bei Psoriasis nachgewiesen werden, v.a. am Plaquerand (Higashiyama et al. 1994) und es wird vermutet, dass eine verstärkte Sekretion von IL-6 und IFN- γ eine erhöhte TGF- α -Expression in Plaques hervorruft (Gottlieb 1990). Ein weiteres Zytokin, welches verstärkt bei der Psoriasis und teilweise bei der Neurodermitis exprimiert wird (Hänel et al. 2013), ist das IFN- γ , welches von Th1-Zellen ausgeschüttet wird. Die Keratinozyten besitzen einen IFN- γ -Rezeptor und können selbst IFN- γ produzieren (Uchi 2000); es ist beteiligt an antiviralen Zellantworten, Zellwachstum und Differenzierung. Auch kann das Zytokin konzentrationsabhängig das Keratinozytenwachstum inhibieren (Shirakata et al. 2010). Außerdem konnte bei der Psoriasis ein erhöhtes Expressionsniveau von IFN- γ festgestellt werden; die Erkrankung wird durch das IFN- γ noch verstärkt

(Christophers 1996), infolgedessen werden inflammatorische Mechanismen und Keratinozytenhyperproliferation aktiviert, die vermutlich zu dem Erscheinungsbild der Psoriasis beitragen. Es wird zudem berichtet, dass die Th1-Zytokine auch an der Induktion der Apoptose von Keratinozyten, vor allem in der chronischen Phase der Neurodermitis, beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass IFN- γ den so genannten Fas-Rezeptor heraufreguliert und damit anschließend die Apoptose einleitet. Dieser Mechanismus könnte eine wichtige Rolle in der Exazerbation und Aufrechterhaltung der Läsionen in atopischer Haut spielen (Breuer et al. 2006).

In psoriatischen Läsionen konnte des Weiteren eine Überexpression von IL-15 in nachgewiesen werden und in Keratinozyten unter entzündlichen Bedingungen beobachtet werden. Außerdem stimuliert IL-15 die IL-17-Expression und es wird vermutet, dass das Zytokin durch die Verbindung zu den Th17-Zellen bei der Inflammation der Psoriasis mitwirkt (Elder 2007). Interessanterweise wird das Zytokin bei der Neurodermitis vermindert von mononukleären Zellen sezerniert. In atopischer Haut, sowohl in der akuten als auch der chronischen Phase, ist zudem die IL-15-Produktion vermutlich geringer als bei der Psoriasis, da sich hier deutlich weniger IL-15-positive Zellen nachweisen lassen (Ong et al. 2002). Das IL-17 spielt vor allem in der Psoriasis-therapie eine wichtige Rolle, denn die Anwendung von Antikörpern gegen IL-17 führt zur Besserung der klinischen Symptome bei Psoriasis (Hänel et al. 2013). Darüber, wie sich das IL-17 in neurodermitischer Haut verhält, ist noch recht wenig bekannt, auch wenn teilweise über eine Expression in akuten Läsionen der Neurodermitis im Vergleich zum chronischen Zustand oder normaler Haut berichtet wird (Brandt et al. 2011). Bei dem IL-18 berichten die Autoren, dass es verstärkt sowohl in der Psoriasis als auch Neurodermitis exprimiert wird (Tüzün et al. 2007). In Studien fand man heraus, dass die Keratinozyten den IL-18 α -Rezeptor (IL-18R α) auf der Oberfläche exprimieren und dieser wird durch IFN- γ hochreguliert. Zusätzlich kann IL-18 nicht nur die Th1-Antworten verstärken, sondern ist auch in der Lage in Anwesenheit von IL-12 naive CD4⁺-T-Zellen sich in Th2-Zellen differenzieren zu lassen und IL-4 zu produzieren (Gröne 2002). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Genexpression des IL-20 (sowie weiterer dieser Gruppe zugehörigen Zytokine wie IL-19, -22 und -24) bei der Psoriasis erhöht ist (Tüzün et al. 2007; Sabat et al. 2011). IL-20-mRNS ist vermehrt heraufreguliert in Läsionen von Psoriatikern im Vergleich zur gesunder Haut und bewirkt die Proliferation von Keratinozyten, dabei induziert es dosisabhängig eine Akanthose oder Hyperplasie in der

Epidermis (Tüzün et al. 2007; Hänel et al. 2013), deswegen werden diese Zytokine als therapeutische Ziele bei der Behandlung von Psoriasis diskutiert. Außerdem wurde eine IL-6-Genexpression verstärkt in psoriatischen Hautläsionen nachgewiesen (Hänel et al. 2013). Das Zytokin IL-6, wie oben erwähnt, wird von den Th-17-Zellen produziert. Humane Keratinozyten können durch den IL-6-Rezeptor, den sie selbst besitzen, ihre eigene Proliferation verstärken. Es konnte noch nicht vollständig geklärt werden, inwieweit IL-6 therapeutisch eingesetzt werden könnte bei der Behandlung der Psoriasis, obwohl die hohen IL-6-Spiegel bei Psoriatikern, vermutlich bedingt durch die Barrierestörung und damit verbundenem Infektionsrisiko, eine wichtige Rolle einnehmen (Hänel et al. 2013).

Bei der Neurodermitis, im Gegensatz zur Psoriasis, gehen die Th1-Zellen vermehrt durch Apoptose zugrunde und damit treten Th2-Zellen an deren Stelle, wobei erwähnt werden muss, dass dies vor allem beim akuten klinischen Bild der Fall ist. Bei chronischen Läsionen dominieren die Th1-Zellen (Breuer et al. 2006). In Verbindung mit Th2-Zellen und demnach mit der Neurodermitis, sind folgende Zytokine von großer Bedeutung, die von diesen ausgeschüttet werden : IL-4, IL-5, IL-13 und IL-31 (Brand et al. 2011). IL-4 und IL-13 teilen sich ähnliche biologische Eigenschaften (Tüzün et al. 2007): sie triggern bei den B-Zellen den Wechsel von IgM zur IgE-Produktion; beide Zytokinrezeptoren werden auf den Keratinozyten exprimiert und stimulieren die IL-6-Ausschüttung durch die Keratinozyten (Uchi 2000). Die IL-4 und -13-mRNS-Expression ist sehr stark ausgeprägt sowohl in allergischer Kontaktdermatitis als auch bei der Neurodermitis (Neis et al. 2006; Hänel et al. 2013). IL-4 wird überwiegend in der Initialphase des akuten Zustandes bei der Neurodermitis exprimiert (Hamid et al. 1994; Hänel et al. 2013) und in vielen Mausversuchen konnte die wichtige Rolle des IL-4 in der Pathogenese der Neurodermitis aufgezeigt werden, denn bei transgenen Mäusen, die eine Überexpression von IL-4 aufwiesen, hat man die typischen Symptome wie Juckreiz, erhöhte Anzahl von inflammatorischen Zellen, bakterielle Hautinfektionen und erhöhte IgG- und IgE-Spiegel, nachweisen können. IL-13 wird sowohl im akuten als auch chronischen Zustand der Neurodermitis exprimiert, obwohl einige Autoren eine signifikante Expressionssteigerung vor allem in subakuten und chronischen Hautläsionen nachweisen konnten (Tazawa et al. 2004; Brandt et al. 2011). IL-13 gibt seine Signale über einen Heterodimerrezeptor, der aus IL-4R α und IL-13R α 1 besteht, weiter und kann auch an den IL-13R α 2 binden, dessen Expression in den Keratinozyten von Th2-Zytokinen bestimmt wird und durch Microarrayanalysen konnte in Hautläsionen von Neurodermitikern eine

erhöhte IL-13R α 2-Expression aufgezeigt werden (Brandt et al. 2011). Weiterhin konnte das IL-5 in erhöhten Spiegeln in neurodermitischer Haut nachgewiesen werden; dieses Zytokin bestimmt die Entwicklung der Eosinophilen, deren Fortbestand und Proliferation. Da IL-4 und IL-13 einzeln typische neurodermitische Symptome hervorrufen können, wird darüber spekuliert, wie IL-5 zur klinischen Symptomatik beiträgt (Brandt et al. 2011). Der Rezeptor des IL-31, ein Heterodimer aus IL-31RA und OSMR, wird von humanen Keratinozyten, aber auch in Makrophagen und aktivierten Monozyten exprimiert. Eine verstärkte Genexpression des IL-31 konnte in Läsionen von Neurodermitikern nachgewiesen werden und korreliert mit dem Expressionsniveau von IL-4 und -13 in atopischer Haut (Brandt et al. 2011; Hänel et al. 2013).

Es zeigt sich somit, dass die Psoriasis und die Neurodermitis durch unterschiedliche und jeweils recht charakteristische Zytokinkonstellationen charakterisiert sind. Die unterschiedliche Abwehrlage bei der Psoriasis und Neurodermitis könnte durch dieses unterschiedliche Zytokinmilieu bedingt sein und damit Einfluss auf die Infektionsanfälligkeit der beiden Erkrankungen nehmen. Neben der Rolle der antimikrobiellen Peptide, wie bereits oben erwähnt, könnte hierbei die Expression der Rezeptoren in bestimmten Schichten der Haut zur unterschiedlichen Anfälligkeit der beiden Erkrankungen beitragen. So wurde in psoriatischen Plaques, insbesondere in den oberen Anteilen der Epidermis, durch Immunfärbung eine verstärkte Expression des TLR 2 im Vergleich zu nichtläsionaler Psoriasis-Haut festgestellt. Es gibt Hinweise auch darüber, dass TLR 5 einer Regulation in psoriatischer Haut, v.a. in der basalen Schicht, unterliegt, dabei soll TLR 5 überraschenderweise jedoch herunterreguliert sein im Vergleich zu nichtläsionaler Haut, ebenfalls gemessen durch histologische Färbungen (Baker et al. 2003).

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Zytokine, u.a. TNF- α und IFN- γ , sowohl die intrazytoplasmatische Expression von TLR-Proteinen als auch deren Expression auf der Oberfläche der Zellen, insbesondere der Keratinozyten, steigern können (Begon et al. 2007). In diesem Zusammenhang spielt TLR 2 bei der Neurodermitis wegen der Erkennung der grampositiven Bakterien (insbesondere *Staphylococcus aureus*) eine bedeutende Rolle (Krishna et al. 2012). Hier wurden in einigen Studien zudem auch Polymorphismen (unter anderem der Einzelnukleotidpolymorphismus R753Q von TLR 2) in TLR oder in deren Signalmolekülen identifiziert, die für die erhöhte Infektionsanfälligkeit verantwortlich sein könnten (Breuer et al. 2006).

In Anbetracht der dargestellten Unterschiede im Zytokinmilieu der beiden Hauterkrankungen sowie der Verbindung zu den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems lag die Untersuchung der Expression der TLR auf humanen Keratinozyten, als wichtigstem Zelltyp der Epidermis, nahe. Diese Arbeit befasst sich mit der Expression des TLR 2 als Vertreter der Erkennung der grampositiven Bakterien, seiner Heterodimerpartner TLR 1 und TLR 6, und der Expression des TLR 5, als Vertreter der Erkennung begeißelter Bakterien, sowie einer möglichen Induzierbarkeit der Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene durch die oben näher beschriebenen Zytokine IL-1 β , IL-4, -5, -6, -13, -15, -17, -18, -20, -31, TGF- α , TNF- α und IFN- γ .

2 Materialien und Methoden

2.1 Vorbereitung der Zellkultur

2.1.1 Präparation und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten

Für die Experimente wurden primäre humane Keratinozyten verwendet, die aus Penisvorhäuten gewonnen wurden. Die Präparation der Vorhäute lief über 3 Tage.

Zunächst wurden die Epidermis und Dermis vollständig vom subkutanem Fettgewebe abpräpariert. Dann wurde die Haut mit einem Skalpell in Streifen von 1-2 mm Breite und 2-3 cm Länge geschnitten, anschließend in Phosphate Buffered Saline (PBS, Firma PAA, Pasching) und in 0,25%iger Trypsinlösung über Nacht (12-24h) bei 4 °C mechanisch aufgetrennt. Am darauffolgenden Tag wurde die Inkubation durch Hinzufügen von Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Firma PAA, Pasching) gestoppt. Die Vorhautstreifen wurden solange mit einer anatomischen Pinzette bearbeitet, bis sich das Stratum corneum löste, um aus den restlichen Schichten der Epidermis die Keratinozyten auszusieben. Danach wurden die Zellen im DMEM-Medium resuspendiert und nach einer Zentrifugation (bei 200 g, 5 Minuten) mit 10 ml EpiLife-Medium in 200 ml kollagenisierte Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät.

2.1.2 Kollagenisieren der Zellkulturplatten

Zur Besserung der Haftung der Keratinozyten in den Platten wurden die Kulturplatten vorher mit Kollagen behandelt. Dazu wurden die Lochplatten für 30 Minuten bei 37 °C mit 10 µl bovinem Kollagen, vermischt mit 1 ml Salzsäure, pro Bohrung inkubiert, dann mit PBS gewaschen und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.3 Passagieren der primären Keratinozyten

Die Keratinozyten konnten aufgrund ihrer begrenzten Lebensfähigkeit 3 bis 4 Passagierungen unterzogen werden. Bei einer Konfluenz von 70 bis 90%, gelegentlich auch bei geringerer Konfluenz, wurde die Zellkulturflasche nach Abgießen des EpiLife-Mediums mit PBS gewaschen. Hinterher wurde in 5 ml einer Lösung, die aus 0,1%igem Trypsin und 0,02%igem EDTA bestand, bei 37 °C für 5-7 Minuten und wasserdampfgesättigter 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Durch mehrmaliges Beklopfen des Zellkulturbodens wurden die Zellen abgelöst

und die Proteolyse wurde durch das Hinzugeben von 10 ml FCS-haltigem DMEM-Medium gestoppt, danach bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Resuspension im EpiLife-Medium wurden die Zellen schließlich für die Versuche in Kulturplatten mit 6 Bohrungen (Sarstedt, Nümbrecht) bei 37 °C kultiviert.

2.2 Durchführung der Versuche

Hauptsächlich wurde bei den Experimenten mit IFN- γ stimuliert, zusätzlich wurden vorher folgende Zytokine getestet: Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Tumor Growth Factor α (TGF- α), Interleukin (IL) 1 β , -4, -5, -6, -13, -15, -17, -18, -20 und -31 (Firma PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA).

2.2.1 Stimulation der Zellkultur mit ausgewählten Zytokinen

Zunächst wurde mit den oben genannten Zytokinen geprüft, welcher der Botenstoffe den deutlichsten expressionssteigernden Effekt auf die Boten-RNS (mRNS) der jeweiligen humanen TLR (hTLR) zeigt. Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden mit dem jeweiligen Zytokin in der Konzentration von 40 ng/ml stimuliert. Die folgenden Versuche wurden dann mit dem hierbei identifizierten Zytokin durchgeführt, in diesem Fall IFN- γ .

2.2.2 Stimulation der Zellkultur mit humanem IFN- γ

Das IFN- γ (Firma PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) wurde in einer Lösung, bestehend aus destilliertem Wasser und 0,1%igem bovinem Albumin (BSA), zu je 10 μ l in einer Konzentration 100 ng/ μ l aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Die Stimulationen erfolgten in verschiedenen Konzentrationen des IFN- γ und für 3 verschiedene Zeitintervalle, nämlich für 8, 16 und 24 Stunden. Dabei wurden die 6 Bohrungen einer Zellkulturplatte mit 10 cm² / Bohrung durch ein neues Nährmedium (EpiLife-Medium), welches die erwünschte Konzentration des IFN- γ enthielt, erneuert. Als Kontrollen wurden ebenfalls 6 Bohrungen mit neuem Nährmedium versorgt. Nach der entsprechenden Zeit wurde das Nährmedium entfernt und anschließend konnte mit der RNS-Isolierung begonnen werden.

2.3 RNS-Isolierung

2.3.1 RNS-Isolierung mit Hilfe des NucleoSpin® RNS-II-Kits

Die RNS-Isolierung wurde anhand des Protokolls des NucleoSpin® RNS-II-Kits durchgeführt. Das Protokoll enthielt bereits einen DNase-Verdauschritt der RNS, somit konnte direkt im Anschluss mit der reversen Transkription begonnen werden oder die RNS wurde bei -80 °C für höchstens eine Woche aufbewahrt.

2.3.2 RNS-Konzentrationsmessung

Bevor mit der reversen Transkription begonnen wurde, wurde in einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) die RNS-Konzentration der Proben errechnet. Dabei wurde die optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge (OD_{260}), welche dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht, und bei 280 nm Wellenlänge (OD_{280}), entsprechend dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen. Wenn sich dabei aus Berechnungen durch den Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} (bei reiner RNS liegt der Wert bei 2,0) Hinweise darauf ergaben, dass eine Verunreinigung mit Proteinen stattgefunden hatte, wurde mittels Gelelektrophorese die Integrität der RNS nochmals überprüft.

2.4 Reverse Transkription (RT)

Um die RNS in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, wurde mit dem GeneAmp® RNS PCR Kit gearbeitet. Hierzu wurde vorweg ein Enzymgemisch von je 10 μl pro Probe aus verschiedenen Substanzen vorbereitet. Das Gemisch bestand je Probe aus: 2 μl RT Puffer, 0,8 μl Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) einer Konzentration von 100mM, 1 μl RNSse Inhibitor, 2 μl Oligodesoxythymidin (Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg), 1 μl Multiscribe™ Reverse Transkriptase (alle Substanzen aus dem Kit entstammen der Firma Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und 3,2 μl destilliertes Wasser (Firma Thermo Scientific TKA, Niederelbert). Danach wurde das einzusetzende Volumen der RNS (verdünnt mit destilliertem Wasser) der jeweiligen Probe zu dem Gemisch hinzugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 μl ergab, damit konnten je nach Einsatz 1-2 μg RNS umgeschrieben werden. Die Proben wurden im Thermocycler der Firma peQLab

Biotechnologie GmbH, Erlangen bei 37°C für 2 Stunden inkubiert, anschließend fand die Enzyminaktivierung bei 85°C statt.

Zum Schluss wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt, bei 1 µg umgeschriebener RNS wurde mit 30 µl, bei 2 µg mit 80 µl destilliertem Wasser verdünnt und bei –20 °C aufbewahrt.

2.5 Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR)

Zur Vervielfältigung der komplementären DNA (cDNA) wurde der Lightcycler® der Firma Roche, Mannheim benutzt. Dafür wurde 1 µl cDNA mit 9 µl des Gemisches, bestehend aus dem SYBR®Advantage Mix der Firma Takara Bioeurope/SAS (Saint Germain-en-Laye, Frankreich), destilliertem Wasser und den Vorwärts- und Rückwärtsprimern der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, versetzt. Dann wurde der Mix in die Kapillaren (Polycarbonate Capillaries for Realtime-PCR, Firma GENAXXON bioscience, Ulm) gegeben und bei 700 g 1 Minute zentrifugiert. Sodann konnte die PCR gestartet werden.

Folgende Temperaturschemata wurden benutzt:

humaner TLR-1- Primer (hTLR1)	Denaturierung	95°C für 10s
	Annealing	60°C für 20s
	Polymerisation	72°C für 15s
humaner TLR-2- Primer (hTLR2)	Annealing	62°C für 20s
humaner TLR-5- Primer (hTLR5)	Annealing	57°C für 20s
humaner TLR-6- Primer (hTLR6)	Annealing	57°C für 20s

Die verwendeten Primersequenzen der humanen TLR-Primer waren folgende:

hTLR1	Vorwärts	5'-AGTGTCTGGTACACGCATGG-3'
	Rückwärts	5'-TTTCAAAAACCGTGTCTGTAAAGAG-3'
hTLR2	Vorwärts	5'-TGTGAACCTCCAGGCTCTG-3'
	Rückwärts	5'-GTCCATATTTCCCACTCTCAGG-3'
hTLR5	Vorwärts	5'-CACCAAACCAGGGATGCTAT-3'
	Rückwärts	5'-ACATCTGAGGCTCCGACATC-3'

hTLR6	Vorwärts	5'-GAATGCAAAAACCCTTCACC-3'
	Rückwärts	5'-CAGGCATTTCCAAGTCGTTT-3'
GAPDH	Vorwärts	5'-CCAGCCGAGCCACATCGCTC-3'
	Rückwärts	5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'

Die jeweiligen PCR-Produkte hatten eine Länge von 104 (hTLR1), 256 (hTLR2), 148 (hTLR5), 217 (hTLR6) und 360 (GAPDH) Basenpaaren.

2.6 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Unversehrtheit der RNS bzw. der Größe der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für das Gelgemisch wurden 2 g Agarose (Firma BIO&SELL, Nürnberg) mit 100 ml TAE-Puffer, welcher aus 0,5 M Ethylenediaminetetraessigsäure (Firma Merck, Darmstadt), 2 M Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Firma SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) und 100%ige Essigsäure bestand, vermischt und bis zum vollständigen Auflösen der Agarose aufgekocht. Dann wurde 30 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Währenddessen wurden die RNS-Proben (oder die PCR-Produkte) mit dem Farbstoff Bromphenolblau (Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt und anschließend in die vorbereiteten Taschen des erstarrten Gels pipettiert. Zusätzlich wurden als DNA Leiter die GeneRuler™ 100bp plus DNA Ladder der Firma Thermo Fisher Scientific, Fermentas aus Waltham, MA, USA verwendet. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 80 V für ca. 1,5 Stunden durchgeführt und im Anschluss wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.7 Statistik

Zur statistischen Analyse der Daten wurden Signifikanzen mit dem zweiseitigen gepaarten Student-t-Test ermittelt. Das Signifikanzniveau entsprach einem $p \leq 0,05$. Wenn in einem Wiederholungsversuch eine Signifikanz nicht reproduzierbar war, wurde das Gesamtergebnis beider Versuche dann als signifikant gewertet, wenn nach einer gemeinsamen statistischen Auswertung der Daten beider Versuche die Signifikanz bestehen blieb.

In den Diagrammen steht * für signifikant ($p \leq 0,05$), ** für sehr signifikant ($p \leq 0,01$) und *** für hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

2.8 Verwendete Substanzen

	<u>Firma</u>	<u>Sitz</u>
<u>Zellkultur</u>		
<u>Epilife Medium:</u> Calciumchlorid 0,06M EDGS (Wachstumsfaktoren) Penicillin/ Streptomycin	Gibco Gibco Gibco	New York, USA New York, USA Karlsruhe
<u>DMEM-Medium:</u> FCS L-Glutamin/Streptonycin Penicillin/ Streptomycin	PAA Gibco Gibco Gibco	Pasching, Österreich Karlsruhe Karlsruhe Karlsruhe
PBS	PAA	Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA Zellkulturplatten mit 6 Bohrungen	Gibco Sarstedt	Karlsruhe Nümbrecht
<u>Stimulation</u>		
alle Zytokine	PeptoTech Inc.	RockyHill, NJ, USA
<u>RNS Isolierung</u>		
NucleoSpin RNS II NucleoSpin rDNAse Set Ethanol Rotipuran Destilliertes Wasser	Macherey-Nagel Macherey-Nagel Carl Roth GmbH+CoKG Thermo Scientific TKA	Düren Düren Karlsruhe Niederelbert
<u>Reverse Transkription</u>		
GeneAmp RNS PCR Kit, bestehend aus 10x RT Puffer 25x dNTP Mix (100mM) RNSse Inhibitor, 100 ul Multiscribe Reverse Transkriptase Oligodesoxythymidin Gerät: RT Light cyclers	Applied Biosystems Eurofins MWG Operon peQLab Biotechnologie	Foster City, CA, USA Ebersberg Erlangen
<u>PCR</u>		
SYBR Advantage Mix Primer Light Cyclers Kapillaren Polycarbonate Capillaries for Realtime-PCR Light cyclers Centrifuge Adapters	Takara Bioeurope/SAS Eurofins MWG Operon Roche GENAXXON bioscience Roche	Saint Germain-en-Laye, Frankreich Ebersberg Mannheim Ulm Mannheim

Materialien und Methoden

<u>Gelelektrophorese</u>		
Agarose	BIO&SELL	Nürnberg
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
TAE Puffer, zusammengesetzt aus:		
Ethelyendiamintetraessigsäure	Merck SERVA Electrophoresis	Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan	Gmbh	Heidelberg
Essigsäure 100%	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
GeneRuler 100bp plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific , Fermentas	Waltham, MA, USA

3 Ergebnisse

3.1 Testung der humanen TLR 1-, 2-, 5-, 6- und GAPDH-Primer

Als erstes wurden die humanen Primer für hTLR 1, 2, 5, 6 sowie die GAPDH auf ihre Funktionstüchtigkeit und die richtige Produktgröße getestet. Dazu wurde mit cDNA-Proben von unstimulierten primären humanen Keratinozyten aus der Zellkultur mit den jeweiligen Primern eine PCR durchgeführt, anschließend erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese mit den PCR-Produkten.

Es ergab sich, dass das PCR-Produkt unter Verwendung der hTLR1-Primer rechnerisch eine Größe von 104, der hTLR2-Primer von 256, der hTLR5-Primer von 148, der hTLR6-Primer 217 und der GAPDH-Primer von 360 Basenpaaren hatten. Die Lage der entsprechenden Banden in der Elektrophorese war mit diesen errechneten Größen gut vereinbar. (Abb.1).

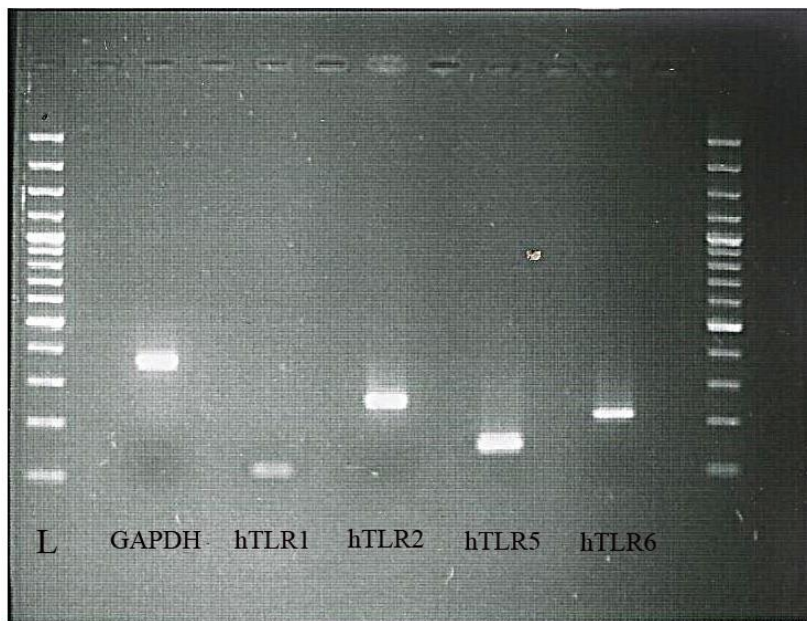


Abb. 1: PCR-Produkte der Primer GAPDH, hTLR 1, 2, 5, 6 von unstimulierten primären Keratinozyten

Rechnerisch erwartete Produktgrößen :

GAPDH = 360 Basenpaare,

hTLR 1 = 104 Basenpaare

hTLR 2 = 256 Basenpaare

hTLR 5 = 148 Basenpaare

hTLR 6 = 217 Basenpaare

L = 100-Basenpaar-DNA-Leiter

3.2 Testung der stimulatorischen Aktivität des Lösungspuffers von IFN- γ

Das Zytokin IFN- γ wurde in einem Lösungspuffer mit 0,1%igem bovinem Serumalbumin (BSA) aufbewahrt. Um zu beweisen, dass der Lösungspuffer keine stimulatorischen Auswirkungen auf die Versuchsreihen hatte, sondern nur das IFN- γ , wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die primären Keratinozyten mit Nährmedium für 24 Stunden versetzt wurden, welches das BSA in einer Konzentration von 0,00005 % enthielt. Dies entspricht der BSA-Konzentration einer Stimulation mit 50 ng/ml IFN- γ in dem oben angegebenen Puffer. Anschließend wurde eine PCR für hTLR 1, 2, 5 und 6 durchgeführt. Es konnte bestätigt werden, dass der Lösungspuffer keine stimulatorische Aktivität besitzt.

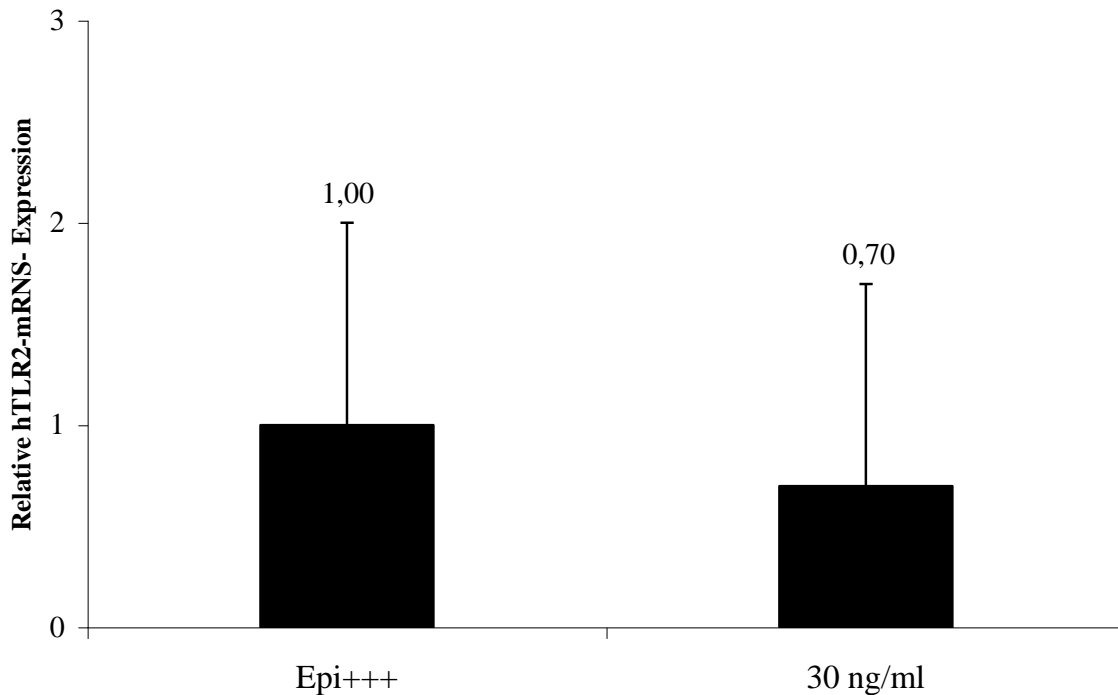


Abb. 2: Relative hTLR2-mRNS-Expression nach Versetzen der Keratinozyten mit BSA-haltigem Epilife-Medium

Dargestellt ist die Expression von hTLR2-mRNS, nachdem die primären Keratinozyten für 24 h mit Epilife-Medium (Nährmedium) versetzt wurden, welches bovines Serumalbumin in der Konzentration 0,00005 % enthielt. Im Vergleich dazu wurde eine unstimulierte Kontrollprobe mit Nährmedium eingesetzt, die gleich 1 gesetzt wurde. Epi+++ bedeutet: +++ besteht aus Calciumchlorid, EDGS (Wachstumsfaktoren) und Penicillin/Streptomycin. Es war keine stimulatorische Aktivität durch das bovine Serumalbumin zu erkennen. (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar)

3.3 Expression der hTLR2-mRNS nach Stimulation von humanen primären Keratinozyten mit verschiedenen Zytokinen

Zu Beginn wurde mit verschiedenen Zytokinen (TNF- α , TGF- α , IL-1 β , -4, -5, -6, -13, -15, -17, -18, -20, -31, IFN- γ) getestet, wie diese die Expression des humanen TLR 2 auf primären Keratinozyten beeinflussen. Die Keratinozyten wurden für 24 Stunden mit den Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml im Epilife-Medium stimuliert. Die Realtime-PCR zeigte, dass die stärkste signifikante Expression der hTLR2-mRNS bei IFN- γ , nämlich um das 7fache im Vergleich zur Kontrolle, erfolgte ($p=0,0058$), deswegen konzentrierte sich die nachfolgende Arbeit vor allem auf Stimulationen mit diesem Zytokin. Zu erwähnen sind ebenfalls IL-4 ($p= 0,0009$), 5 ($p=0,006$) und 1 β ($p=0,014$), bei denen der signifikante Effekt aber weniger stark ausgeprägt war, etwa nur um das 1,7fache bei IL-4, 1,29fache bei IL-5 und 1,73fache bei IL- 1 β im Vergleich zur unstimulierten Probe (Abb.3). Beim Zytokin IL-15 war zwar eine gesteigerte Expression der hTLR2-mRNS zu beobachten, die Steigerung erreichte aber kein signifikantes Niveau. Bei den übrigen Zytokinen, TNF- α , TGF- α , IL-31, IL-6, IL-13, IL-17, IL-18 und IL-20, wurde kaum eine Änderung der Expression der mRNS festgestellt, die relative Expression lag im Bereich der unstimulierten Probe (Abb.4).

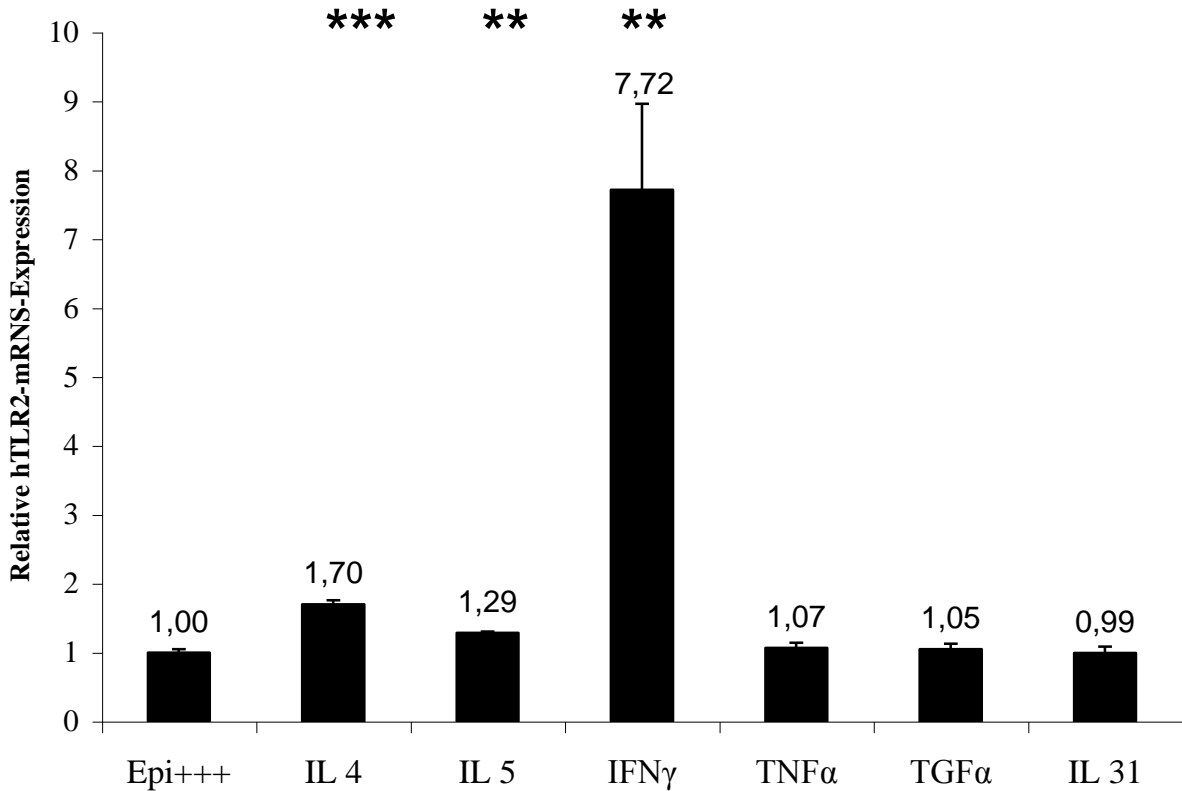


Abb. 3: Relative hTLR2-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml

Dargestellt ist die hTLR2-mRNS-Expression nach der Stimulation mit den Zytokinen IL-4, -5, IFN- γ , TNF- α , TGF- α , IL-31 im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epileife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 3$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

** = sehr signifikant ($p \leq 0,01$)

*** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

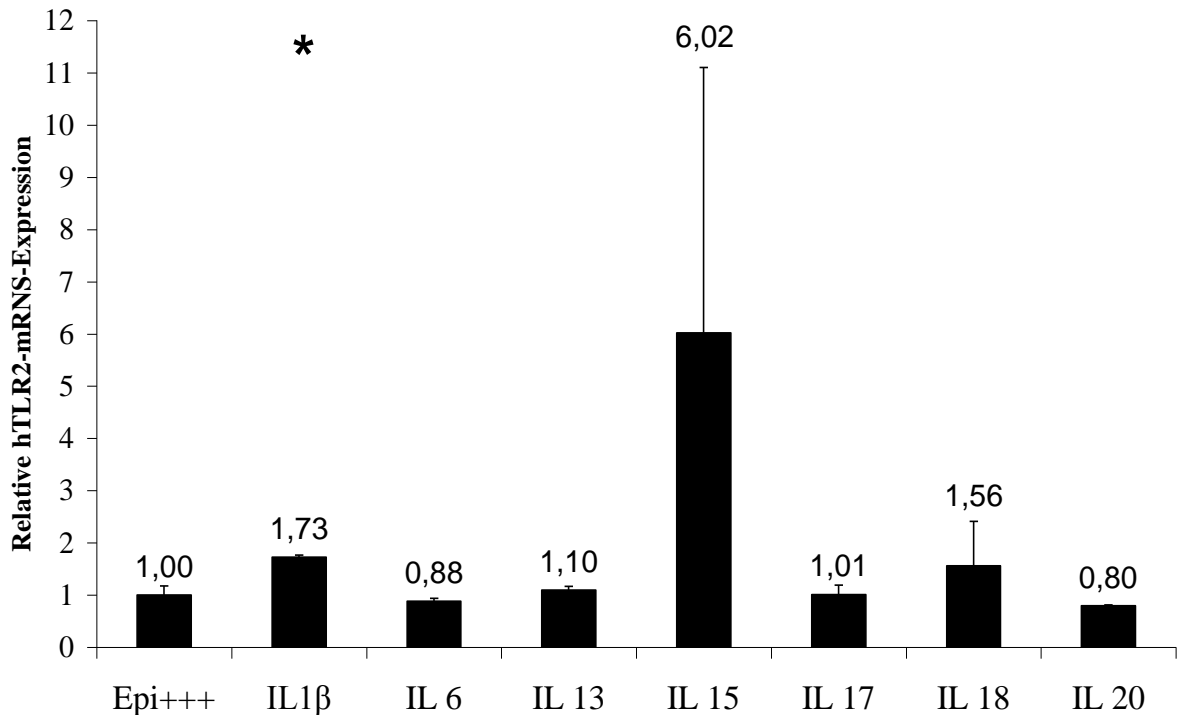


Abb. 4: Relative hTLR2-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml

Abgebildet ist die hTLR2-mRNS-Expression nach Stimulationen mit den Zytokinen IL-1 β , -6, -13, -15, -17, -18 und -20 im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epileife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde. (jeweils n = 3; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

* = signifikant ($p \leq 0,05$)

3.4 Expression der hTLR2-mRNS nach Stimulation von humanen primären Keratinozyten mit IFN- γ

3.4.1 hTLR2-mRNS-Expression bei einer IFN- γ - Konzentration von 5 ng/ml

Am Anfang wurde die niedrigste Konzentration des IFN- γ , nämlich 5 ng/ml, für die Stimulation ausgewählt. 24 Stunden wurden die Keratinozyten mit IFN- γ im Epilife-Medium behandelt.

Die Expressionsverminderung der hTLR2-mRNS bei 5 ng/ml erreichte kein signifikantes Niveau (Abb.5).

Die Wiederholung des Versuches zeigte das gleiche Ergebnis.

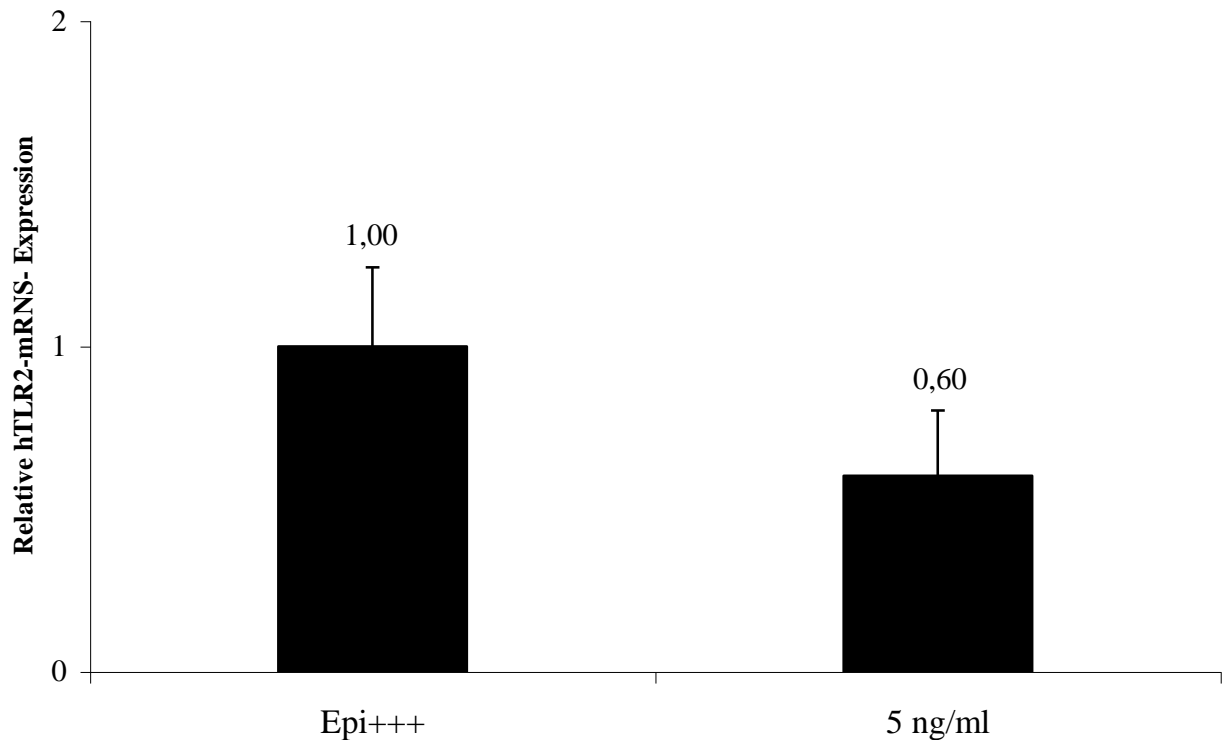


Abb. 5: Relative hTLR2-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach 24h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration von 5 ng/ml

Abgebildet ist die relative hTLR2-mRNS-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epilife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

3.4.2 hTLR2-mRNS-Expression bei einer IFN- γ -Konzentration von 10, 20 und 30 ng/ml

Als zweite Testreihe wurden die Konzentrationen von 10, 20, 30 ng/ml des IFN- γ genommen und ebenfalls für 24 Stunden im Epilife-Medium auf die primären Keratinozyten gegeben.

Bei allen Konzentrationen war eine signifikante Steigerung der Expression der hTLR2-mRNS nachweisbar, und zwar ungefähr um das 5fache im Vergleich zu den Kontrollproben, bei 10 ng/ml (p -Wert=0,0018) hat sich ein sehr signifikantes Ergebnis herausgestellt, bei 20 (p =0,00014) und 30 ng/ml (p =0,0008) ist sogar von einem hoch signifikanten Ergebnis zu sprechen (Abb.6).

Die Wiederholung des Versuches zeigte das gleiche Ergebnis.

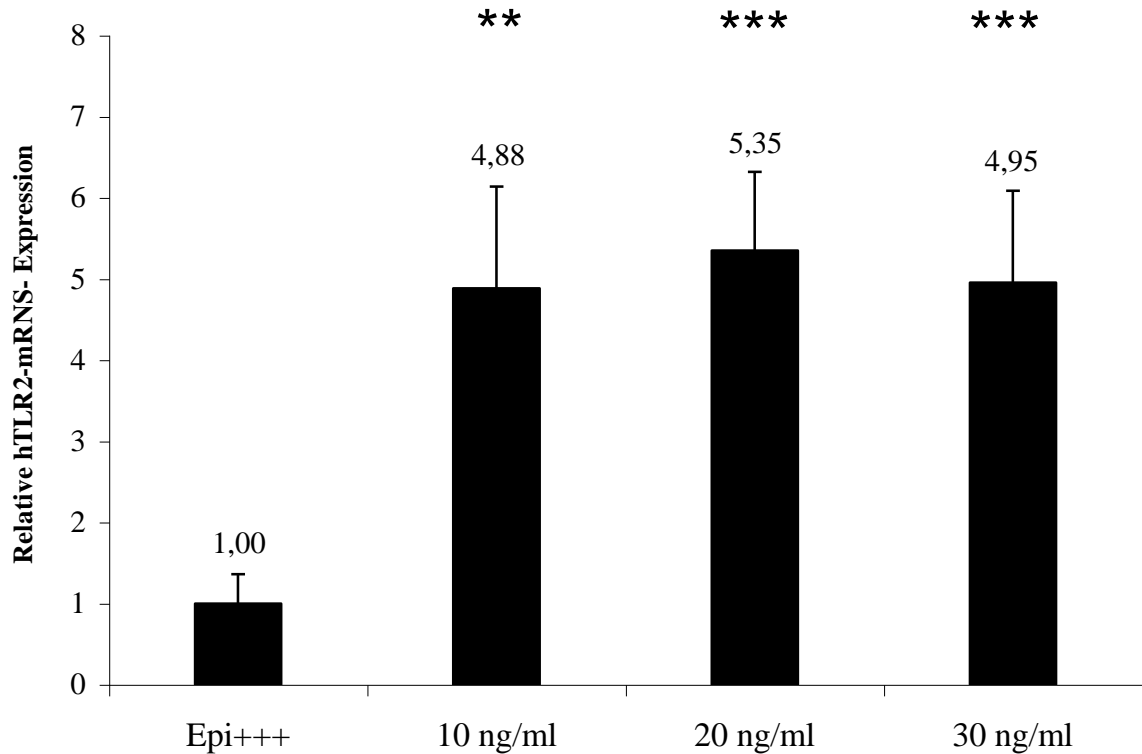


Abb. 6: Relative hTLR2-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentrationen von 10, 20 und 30 ng/ml

Abgebildet ist die relative hTLR2-mRNS-Expression bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

** = sehr signifikant ($p \leq 0,01$)

*** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

3.4.3 hTLR2-mRNS-Expression bei einer IFN- γ -Konzentration von 30, 40 und 50 ng/ml

Zuletzt erfolgte die Stimulation mit einer Konzentration von 30,40, 50 ng/ml des IFN- γ für 24 Stunden im Epilife-Medium. Die Realtime-PCR lieferte folgende Ergebnisse: Bei 30 ng/ml ließ sich eine Steigerung der hTLR2-mRNS-Expression um das 6fache nachweisen, wieder handelte es sich um ein hoch signifikantes Ergebnis ($p=0,00000069$). Bei 40 ($p=0,00015$) und 50 ng/ml ($p=0,00068$) wurde ebenfalls eine hoch signifikante Expressionsteigerung der

hTLR2-mRNS festgestellt, nämlich um das 10fache im Vergleich zur unstimulierten Probe (Abb.7).

Die Wiederholung des Versuches zeigte das gleiche Ergebnis bei der Konzentration 30 ng/ml, bei 40 und 50 ng/ml konnte die Expressionssteigerung nicht als signifikant reproduziert werden. Bei gemeinsamer statistischer Auswertung der Daten aus beiden Versuchen, blieb die statistische Signifikanz jedoch bestehen (30 ng/ml $p=0,00038$; 40 ng/ml $p=0,007$; 50 ng/ml $p=0,018$).

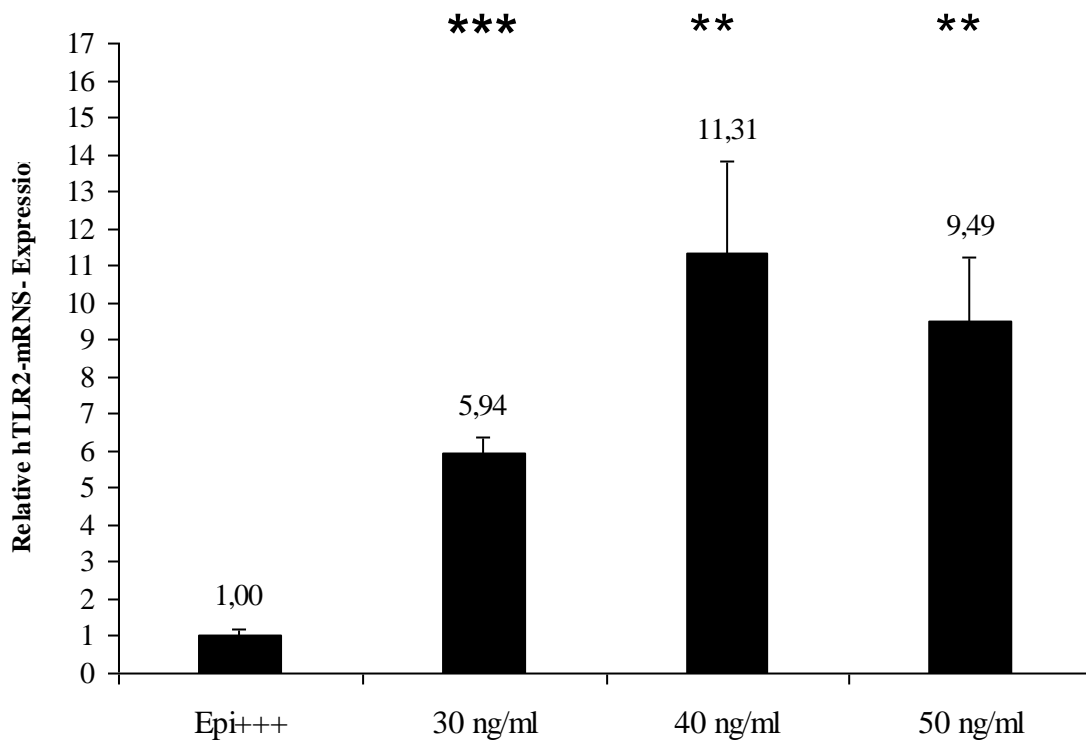


Abb. 7: Relative hTLR2-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit Interferon γ bei Konzentrationen von 30, 40 und 50 ng/ml

Abgebildet ist die Expression der hTLR2-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epilife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde. Bei den Kontrollen, 30 und 50 ng/ml lag die Anzahl der Proben bei 6, bei 40 ng/ml bei 2 Proben (Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

** = sehr signifikant ($p \leq 0,01$)

***= hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

3.5 Expression der hTLR1-, hTLR5-, hTLR6-mRNS nach Stimulation von humanen primären Keratinozyten mit verschiedenen Zytokinen

Die verschiedenen Zytokine (IFN- γ , TNF- α , TGF- α , IL-1 β , -4, -5, -6, -13, -15, -17, -18, -20, -31) wurden außerdem bezüglich der humanen TLR 1, 5 und 6 getestet. Dazu wurde die vorhandene cDNA aus dem Versuch mit hTLR2 (siehe 3.2) verwendet.

Es ergab sich keine signifikante hTLR1-mRNS-Expressionsänderung bei den ausgewählten Zytokinen. Es kam zur Steigerung der mRNS-Expression bei IL-15 um das 3fache im Vergleich zur Kontrolle, ohne ein signifikantes Niveau zu erreichen. Bei IFN- γ , IL-1 β , -6, -20 und -31 war die Expression von hTLR1 ohne Signifikanz vermindert und bei den restlichen Zytokinen zeigte sich nur eine minimale Steigerung im Vergleich zur Kontrollprobe (Abb.8 und 9).

Bei der Expression der mRNS von hTLR5 konnte nur bei IL-5 eine sehr signifikante Hochregulation ($p=0,0031$) der Rezeptoren um das 1,4fache im Vergleich zu Kontrolle festgestellt werden. Bei IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , -4 und -6 ergab sich eine Verminderung der hTLR5-Expression ohne Signifikanz, bei IL-15 eine Steigerung um das 3fache ohne Signifikanz, die anderen Zytokine lagen im Bereich der unstimulierten Probe (Abb.10 und 11).

Die hTLR6-mRNS-Expressionsteigerungen lagen bei IL-15 um das 10fache, bei IL-18 um das 4fache, erreichten kein signikantes Niveau. Bei IL-13 und IFN- γ fand eine Verminderung der hTLR6-mRNS-Expression ohne Signifikanz statt (Abb. 12 und 13).

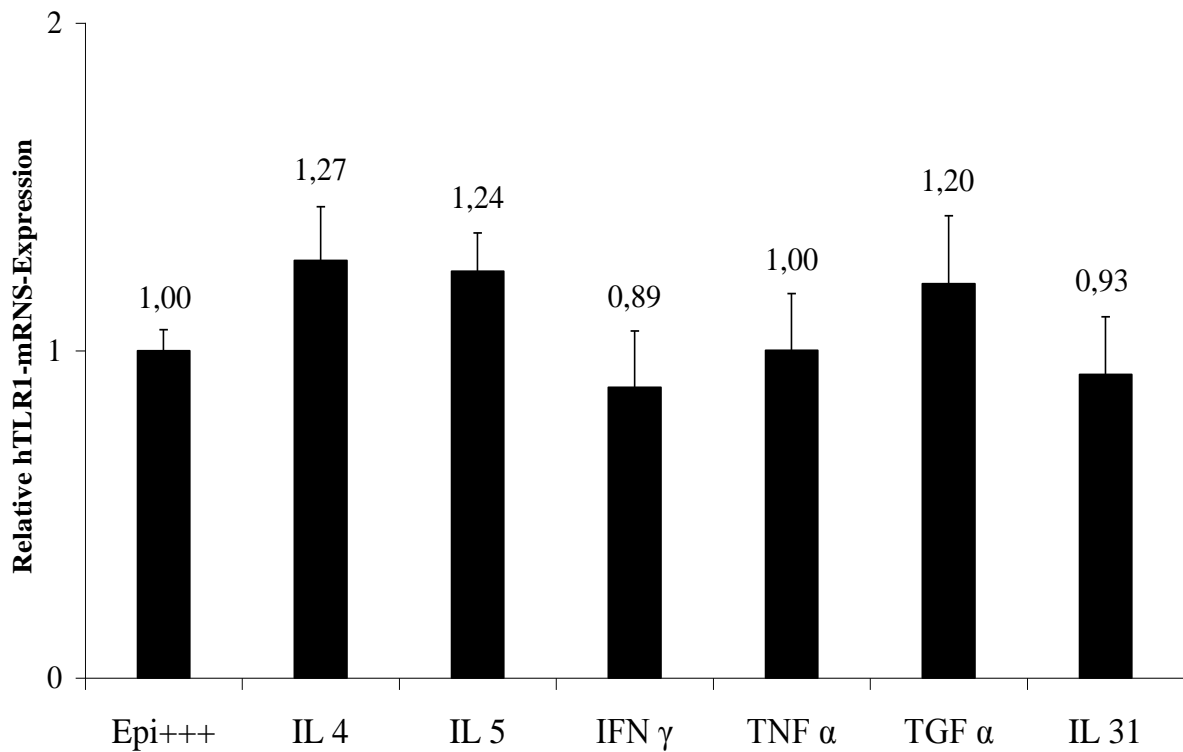


Abb. 8: Relative hTLR1-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml
Dargestellt ist die relative hTLR1-mRNS-Expression nach Stimulation mit den Zytokinen IL-4, -5, IFN- γ , TNF- α und TGF- α , IL-31 im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Eplife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils n = 3; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

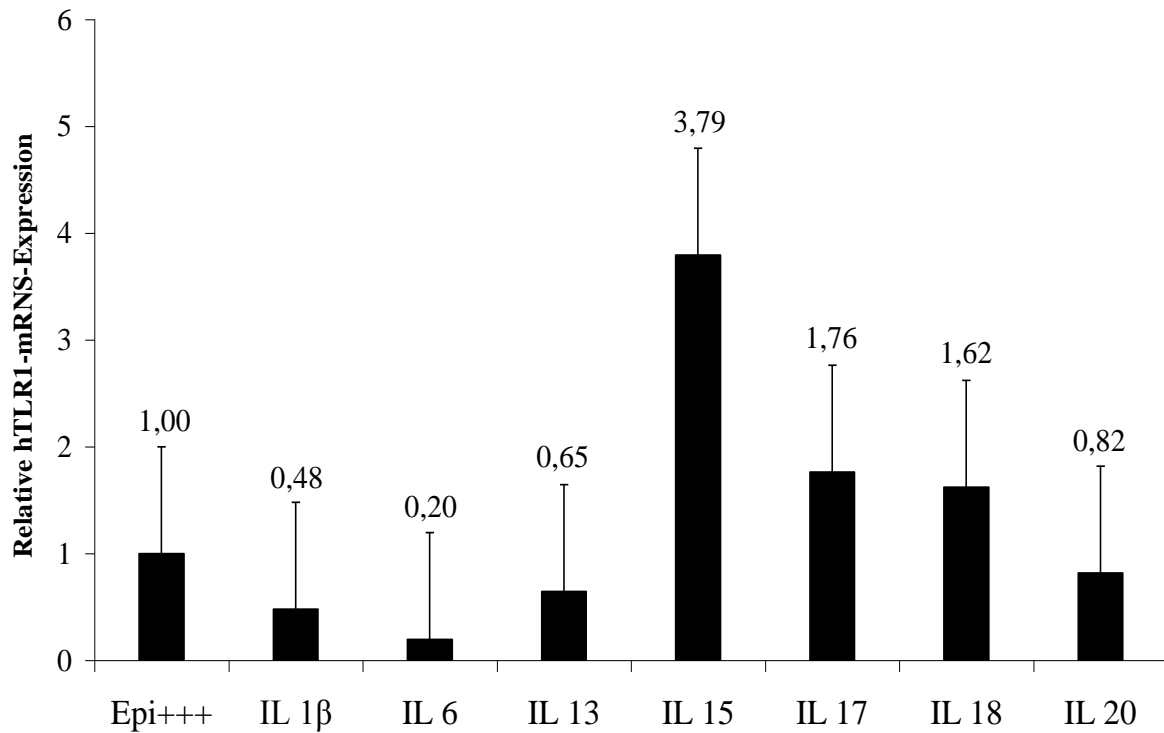


Abb. 9: Relative hTLR1-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml

Dargestellt ist die relative hTLR1-mRNS-Expression nach Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β , -6, -13, -15, -17, -18 und -20 im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils n=3; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

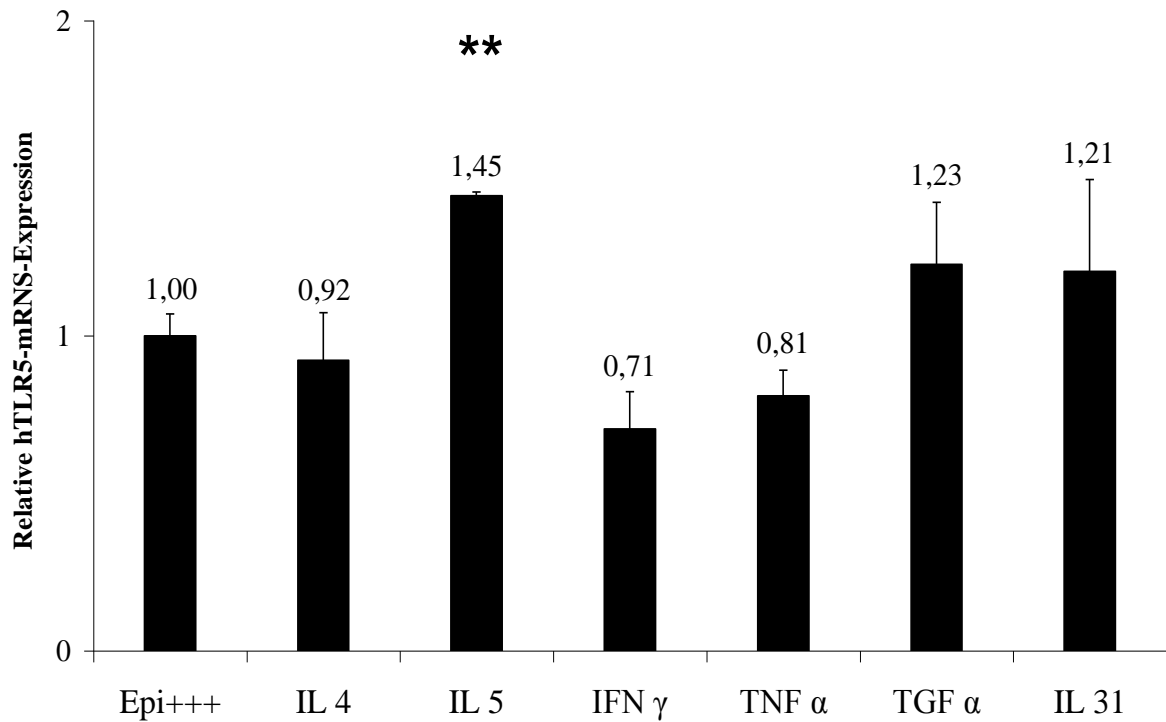


Abb. 10: Relative hTLR5-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml

Dargestellt ist die relative hTLR5-mRNS-Expression nach Stimulation mit den Zytokinen IL-4, -5, IFN- γ , TNF- α und TGF- α , IL-31 im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epilife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde. (jeweils $n = 3$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

** = sehr signifikant ($p \leq 0,01$)

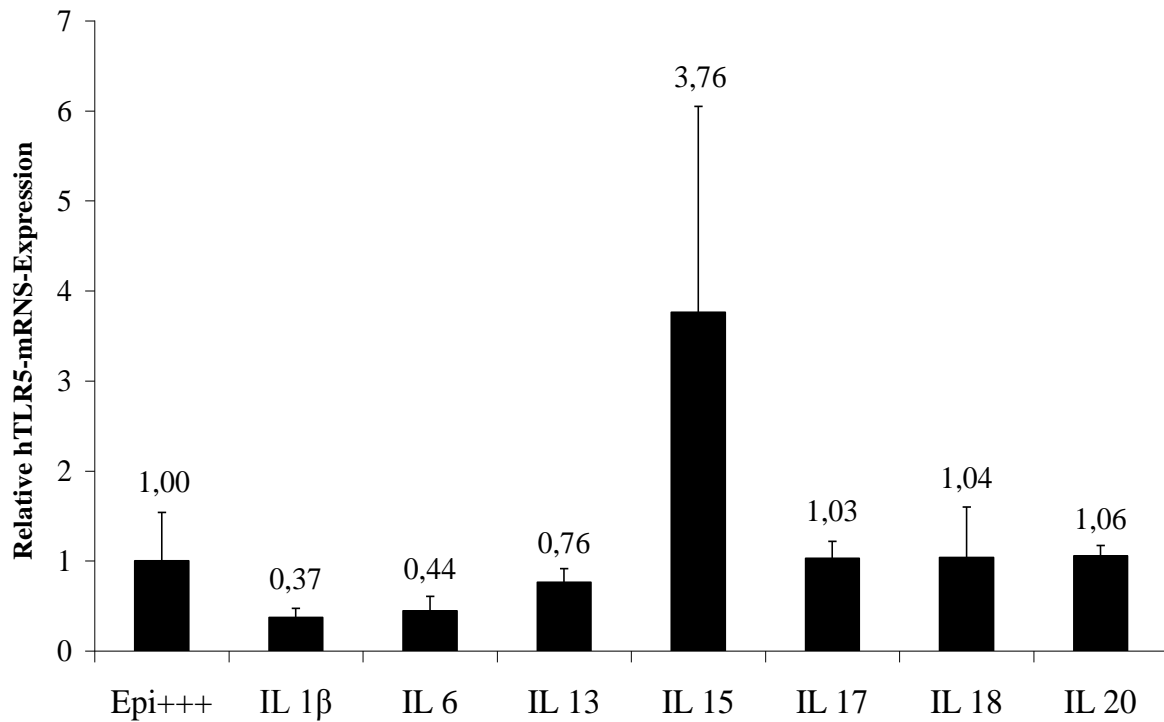


Abb. 11: Relative hTLR5-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml

Dargestellt ist die relative hTLR5-mRNS-Expression nach Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β , -6, -13, -15, -17, -18 und -20 im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde. (jeweils n = 3; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar)

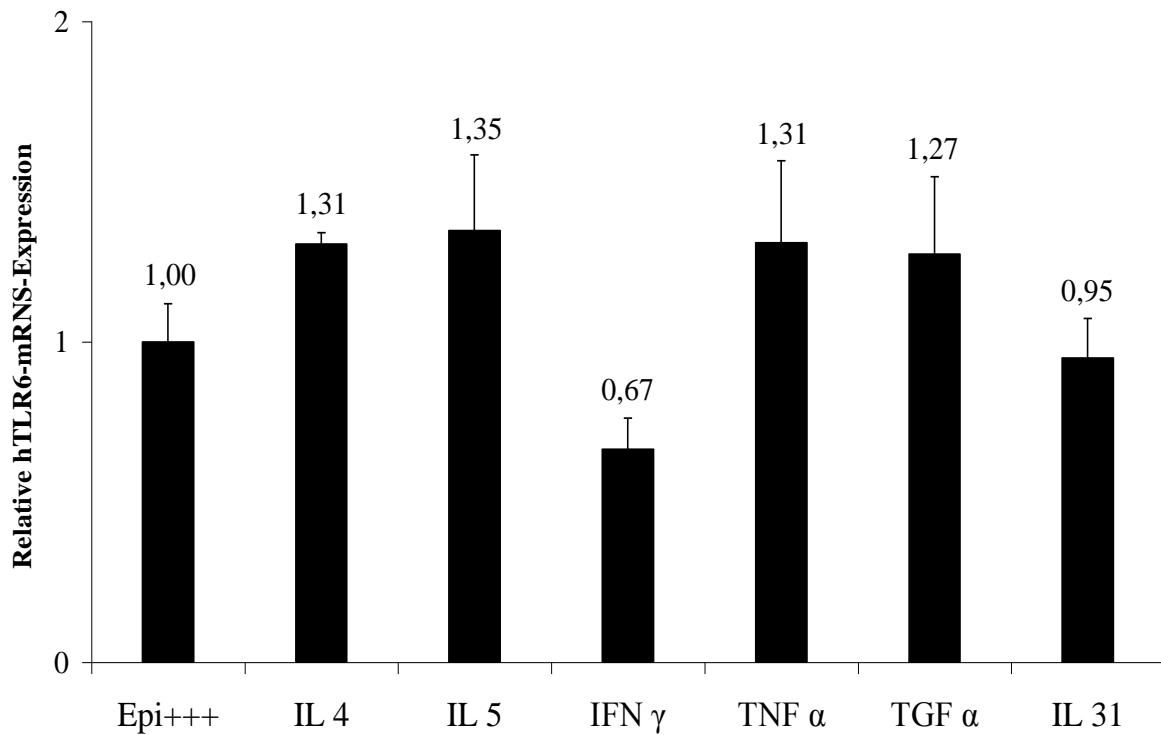


Abb. 12: Relative hTLR6-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml

Dargestellt ist die relative hTLR6-mRNS-Expression nach Stimulation mit den Zytokinen IL-4, -5, IFN- γ , TNF- α und TGF- α , IL-31 im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 3$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

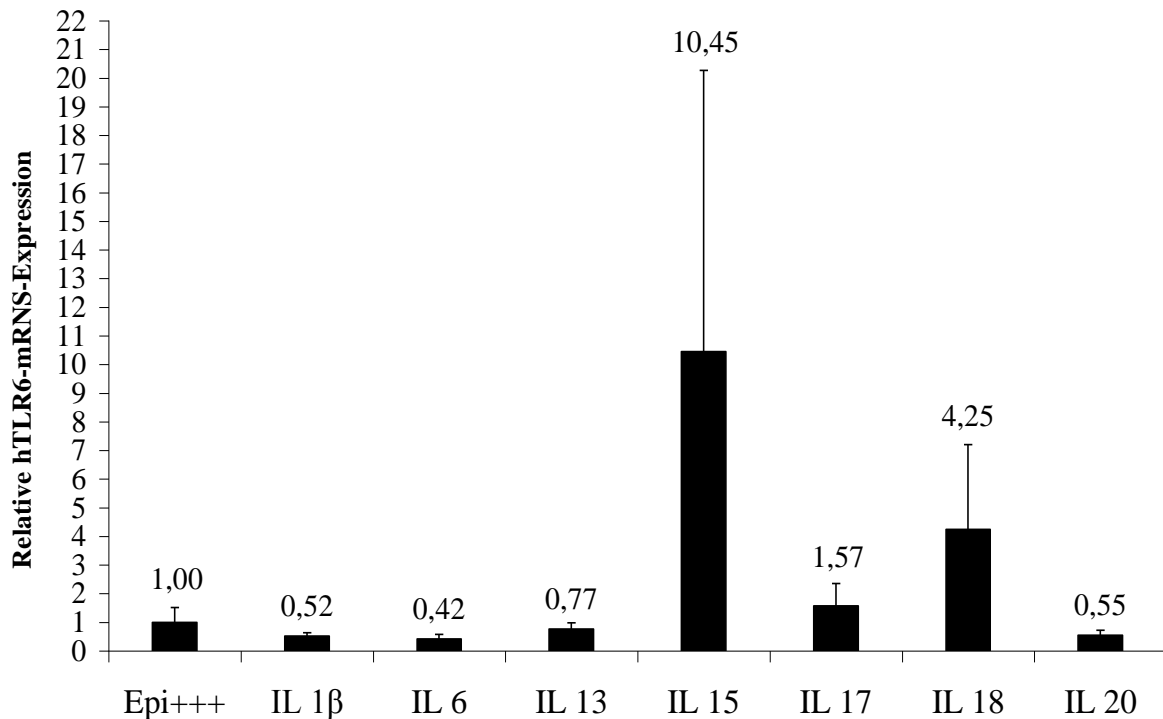


Abb. 13: Relative hTLR6-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit verschiedenen Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml

Dargestellt ist die relative hTLR6-mRNS-Expression nach Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β , -6, -13, -15, -17, -18 und -20 im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils n = 3; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

3.6 Expression der hTLR1-, hTLR5-, hTLR6-mRNS nach Stimulation von humanen primären Keratinozyten mit verschiedenen Konzentrationen von IFN- γ

3.6.1 Expression von hTLR1-mRNS nach 24h-Stimulation mit IFN- γ

Für die Überprüfung der Auswirkung der verschiedenen Konzentrationen von IFN- γ auf die hTLR1-mRNS-Expression wurde mit cDNA-Proben von den Hauptversuchen (Konzentrationen von 5, 10, 20, 30, 40, 50 ng/ml) eine Realtime-PCR durchgeführt. Bei 30 ng/ml fand eine nicht signifikante Verminderung der hTLR1-mRNS-Expression im Vergleich zur Kontrolle statt. Bei 10 und 20 ng/ml war keine signifikante Steigerung oder

Verminderung der mRNS zu beobachten, bei 50 ng/ml fand eine signifikante Steigerung um das 3,27fache im Vergleich zur Kontrolle statt ($p=0,027$) (Abb.14, 15, 16).

Die Wiederholung des Versuches zeigte das gleiche Ergebnis, außer bei der Stimulation mit der Konzentration 50 ng/ml, da konnte ein signifikantes Ergebnis nicht reproduziert werden. Bei gemeinsamer statistischer Auswertung der Daten aus beiden Versuchen, ergab sich insgesamt ebenfalls kein signifikanter Effekt, so dass das Ergebnis insgesamt als nicht signifikant zu bewerten ist (bei 50 ng/ml $p= 0,156$).

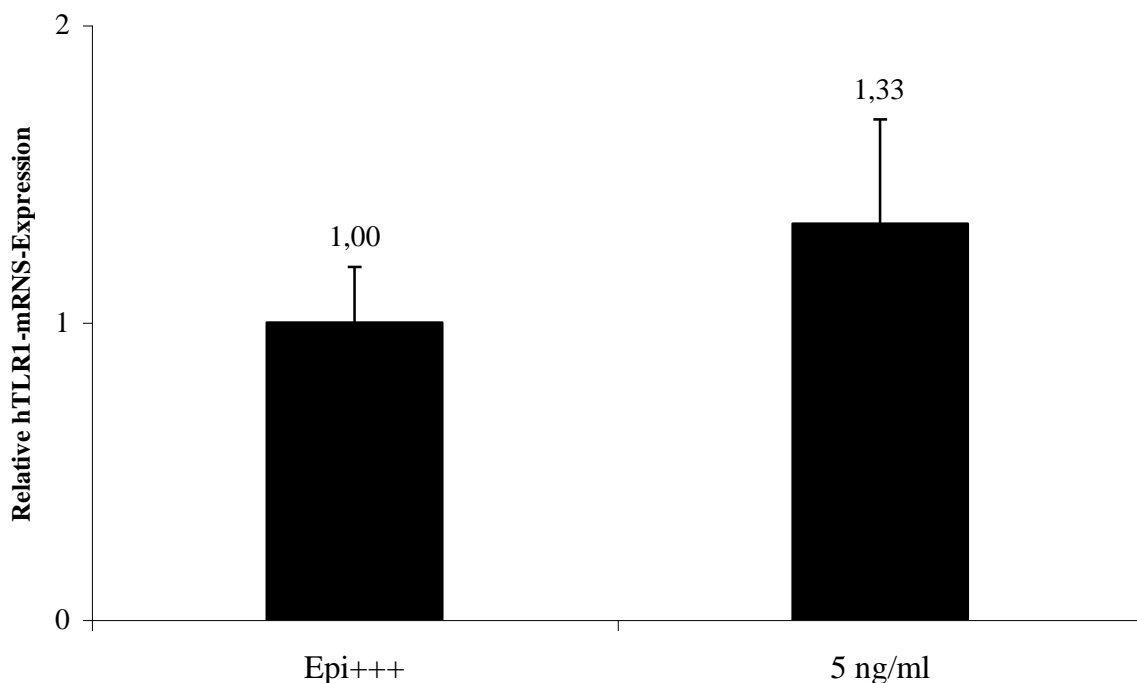


Abb. 14: Relative hTLR1-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach 24h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration von 5 ng/ml

Abgebildet ist die relative hTLR1-mRNS-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epilife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwertes dar).

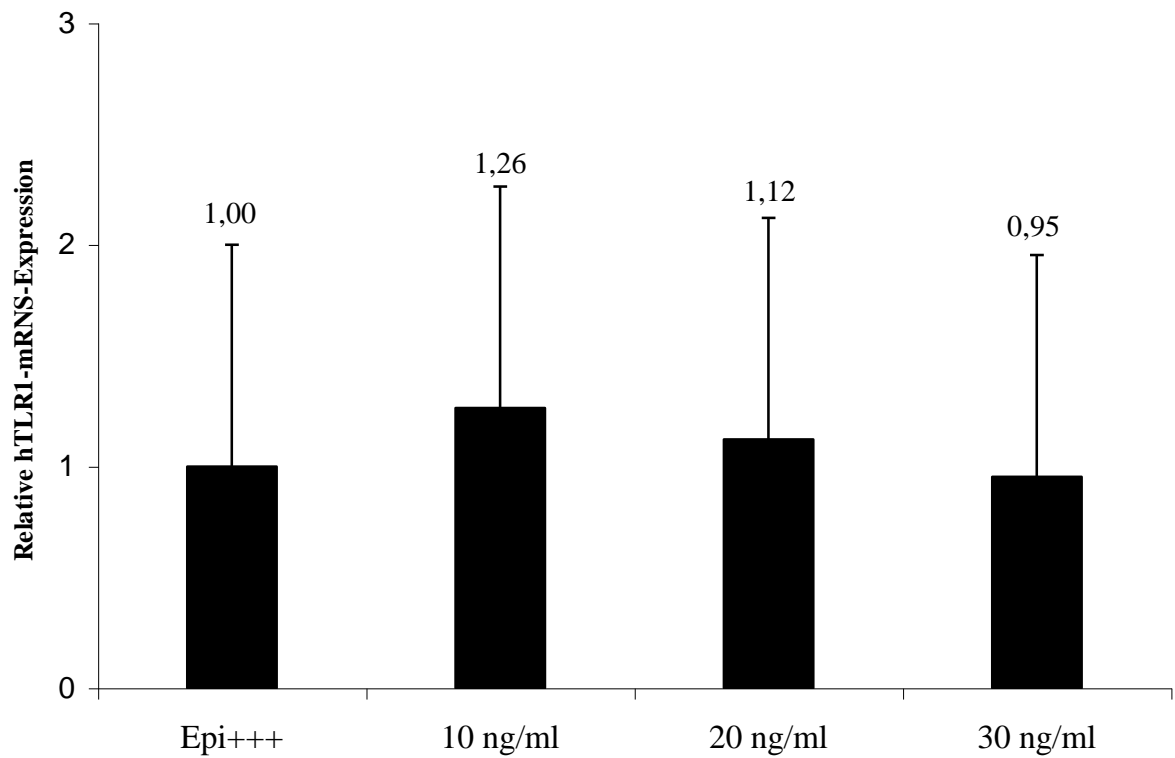


Abb. 15: Relative hTLR1-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24 h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentrationen von 10, 20 und 30 ng/ml

Abgebildet ist die relative hTLR1-mRNS-Expression bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$, bei 30 ng/ml $n = 5$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwertes dar).

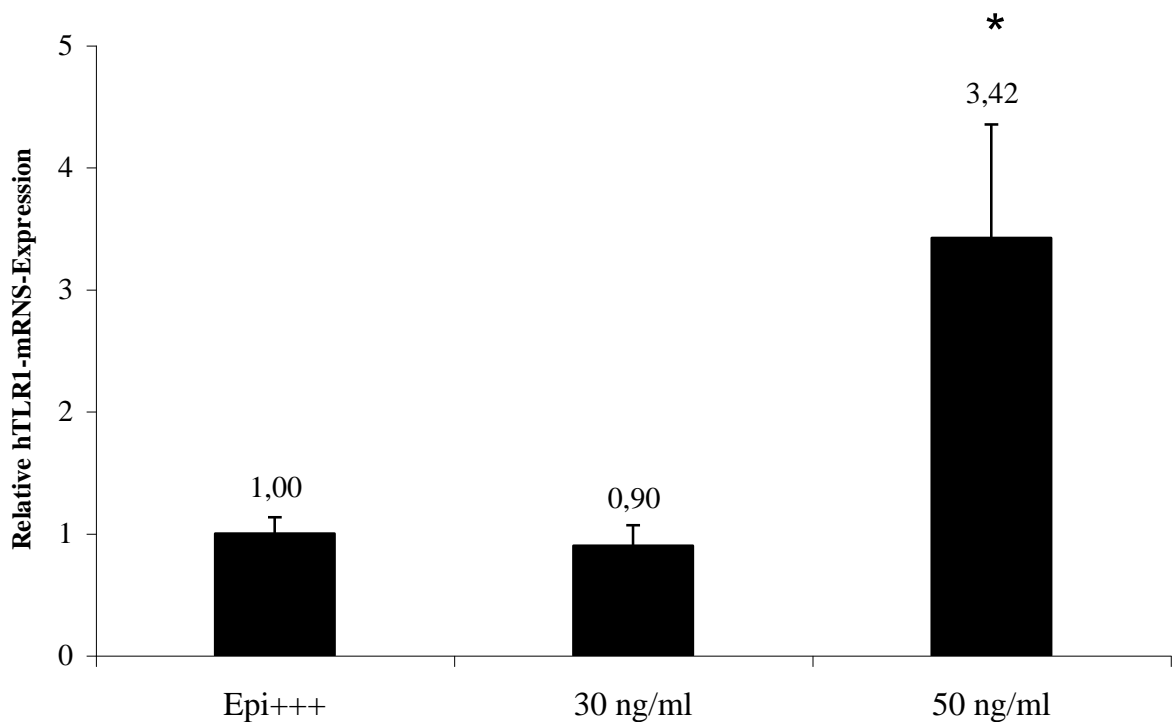


Abb. 16: Relative hTLR1-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit IFN- γ bei Konzentrationen von 30 und 50 ng/ml

Abgebildet ist die Expression der hTLR1-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epilife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

* = signifikant ($p \leq 0,05$)

3.6.2 Expression von hTLR5-mRNS nach 24h-Stimulation mit IFN- γ

Gleichermaßen wie im Abschnitt 3.5.1 beschrieben, erfolgte auch der Versuch zur Untersuchung der Expression von hTLR5-mRNS. Es fand eine Verminderung der mRNS-Expression bei einer 30 ng/ml Konzentration von IFN- γ um das 0,68fache im Vergleich zur Kontrolle statt, wobei ein signifikantes Ergebnis erreicht werden konnte ($p=0,038$). Die Expression bei den anderen Konzentrationen lag um den Wert der unstimulierten Probe (Abb. 17, 18, 20).

Die Wiederholung des Versuches zeigte das gleiche Ergebnis, ausgenommen bei der Stimulation mit der Konzentration 30 ng/ml, da konnte ein signifikantes Ergebnis nicht reproduziert werden (Abb. 19). Bei gemeinsamer statistischer Auswertung der Daten aus beiden Versuchen, ergab sich insgesamt ebenfalls kein signifikanter Effekt, so dass das

Ergebnis insgesamt als nicht signifikant zu bewerten ist (bei 10 ng/ml $p=0,732$; 20 ng/ml $p=0,558$; 30 ng/ml $p=0,098$).

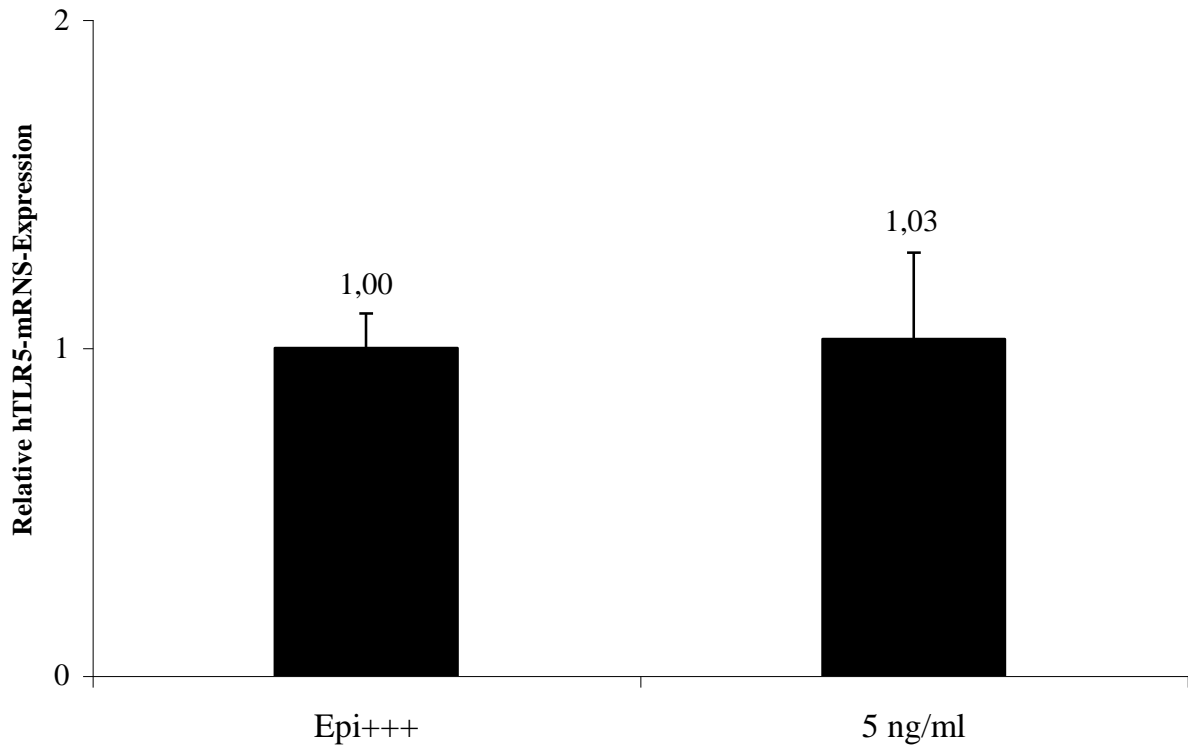


Abb. 17: Relative hTLR5-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach 24h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration von 5 ng/ml

Abgebildet ist die relative hTLR5-mRNS-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

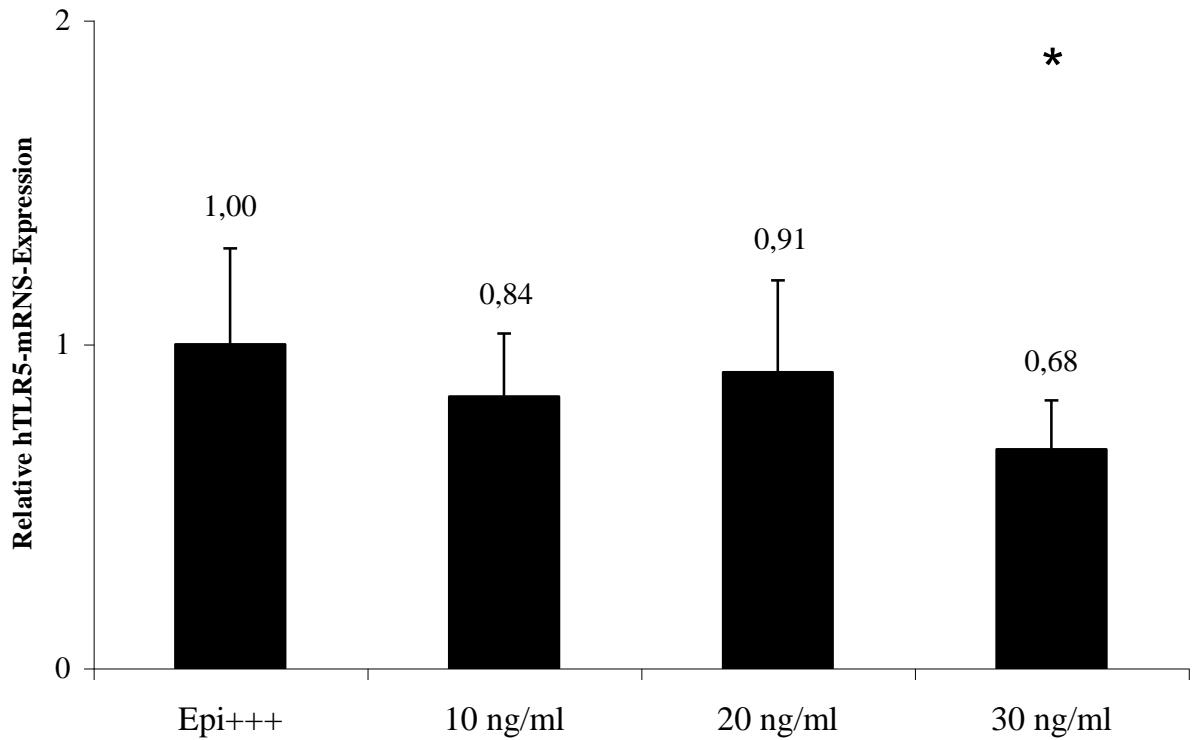


Abb. 18: Relative hTLR5-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentrationen von 10, 20 und 30 ng/ml

Abgebildet ist die relative hTLR5-mRNS-Expression bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

* = signifikant ($p \leq 0,05$)

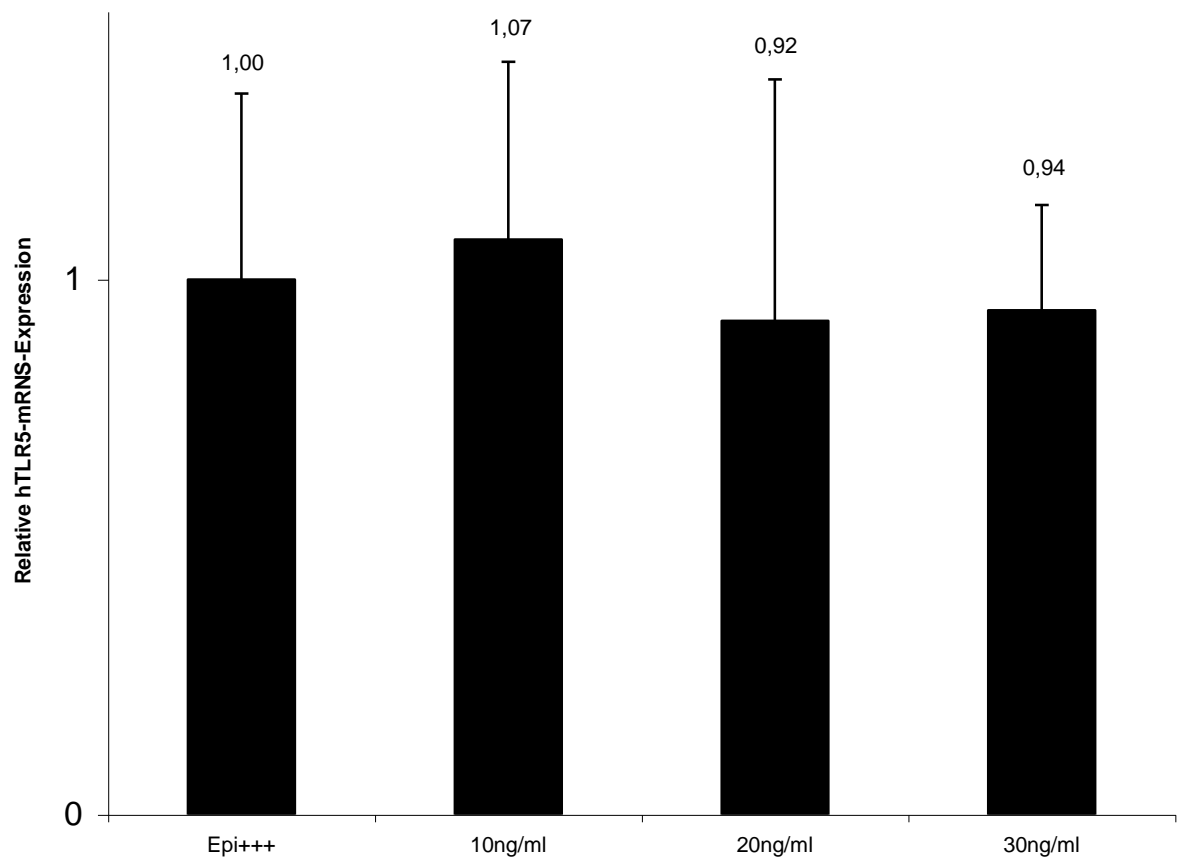


Abb. 19: Relative hTLR5-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentrationen von 10, 20 und 30 ng/ml im Wiederholungsversuch

Abgebildet ist die relative hTLR5-mRNS-Expression bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epileife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

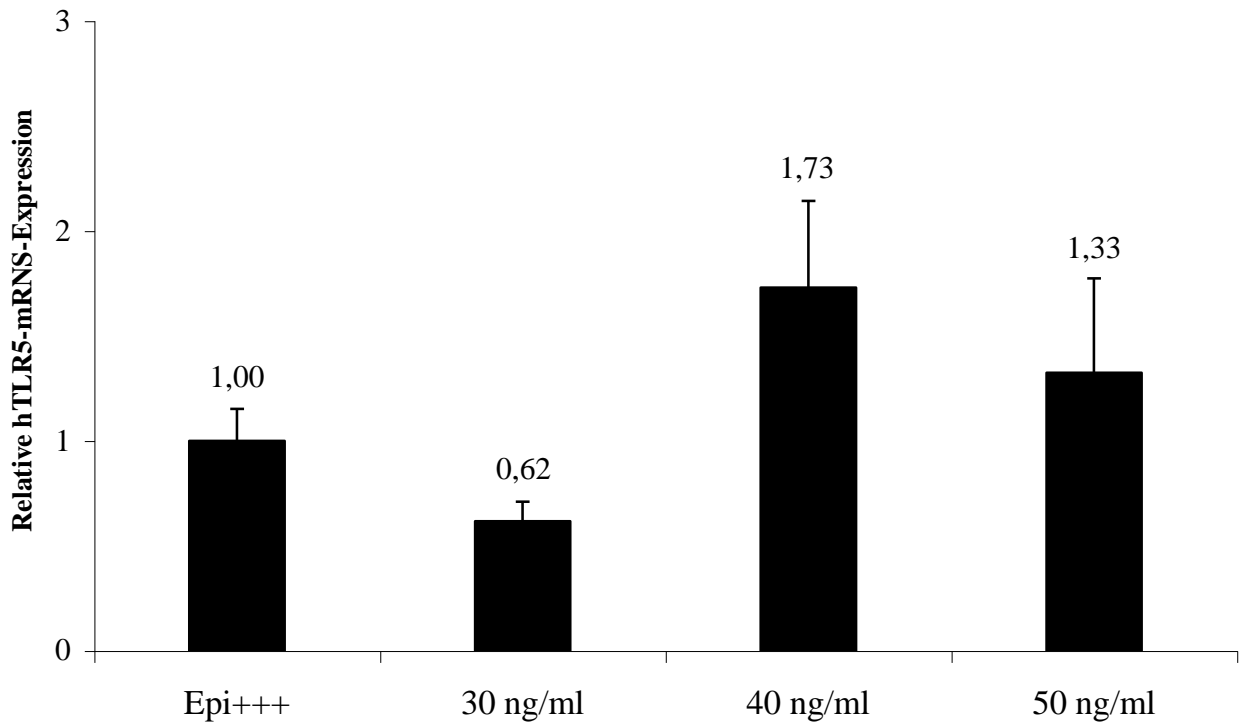


Abb. 20: Relative hTLR5-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit IFN- γ bei Konzentrationen von 30, 40 und 50 ng/ml

Abgebildet ist die Expression der hTLR5-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde. Bei 30 und 50 ng/ml lag die Anzahl der Proben bei 6, bei 40 ng/ml bei 2 Proben (Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

3.6.3 Expression von hTLR6-mRNS nach 24h-Stimulation mit IFN- γ

Bei der hTLR6-mRNS ergab sich bei keiner der unterschiedlichen Konzentrationen des IFN- γ eine signifikante Expressionsänderung, bei allen Konzentrationen war eine tendenzielle Verminderung der mRNS-Expression festzustellen, nur bei 50 ng/ml lag diese im Bereich der unstimulierten Probe (Abb. 21, 22, 23).

Die Wiederholung des Versuches zeigte das gleiche Ergebnis.

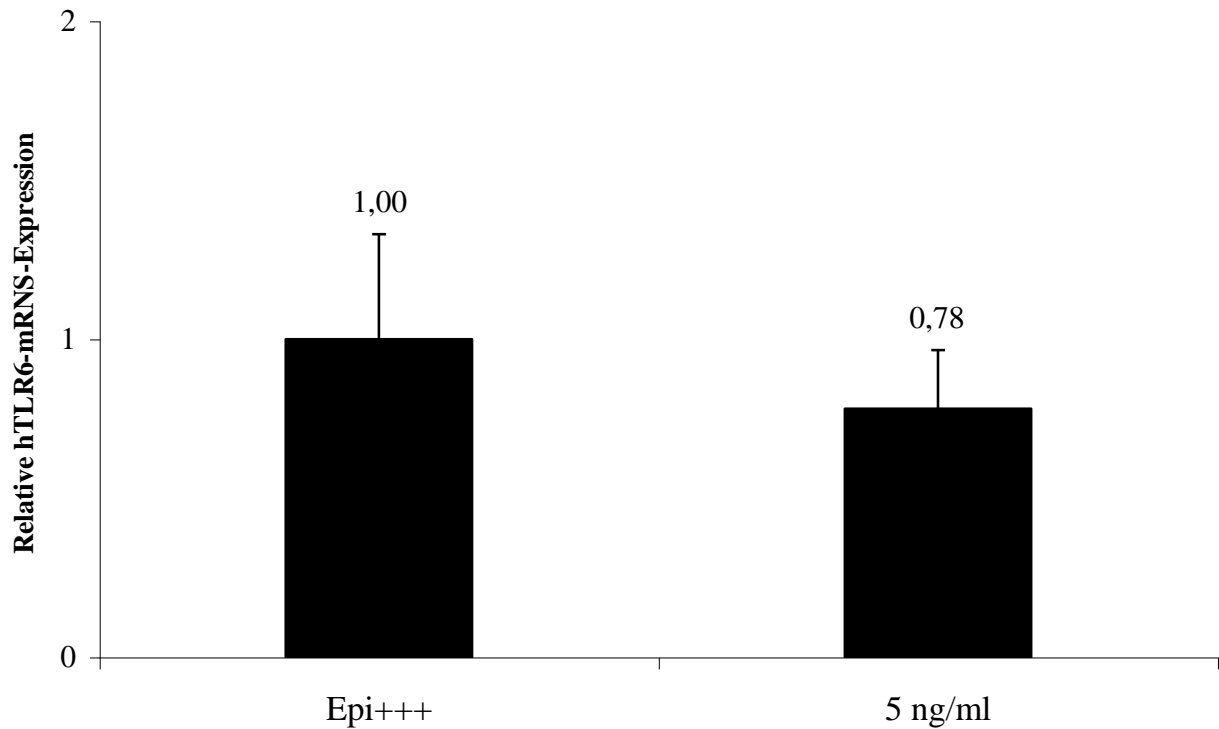


Abb. 21: Relative hTLR6-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach 24h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration von 5 ng/ml

Abgebildet ist die relative hTLR6-mRNS-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwertes dar).

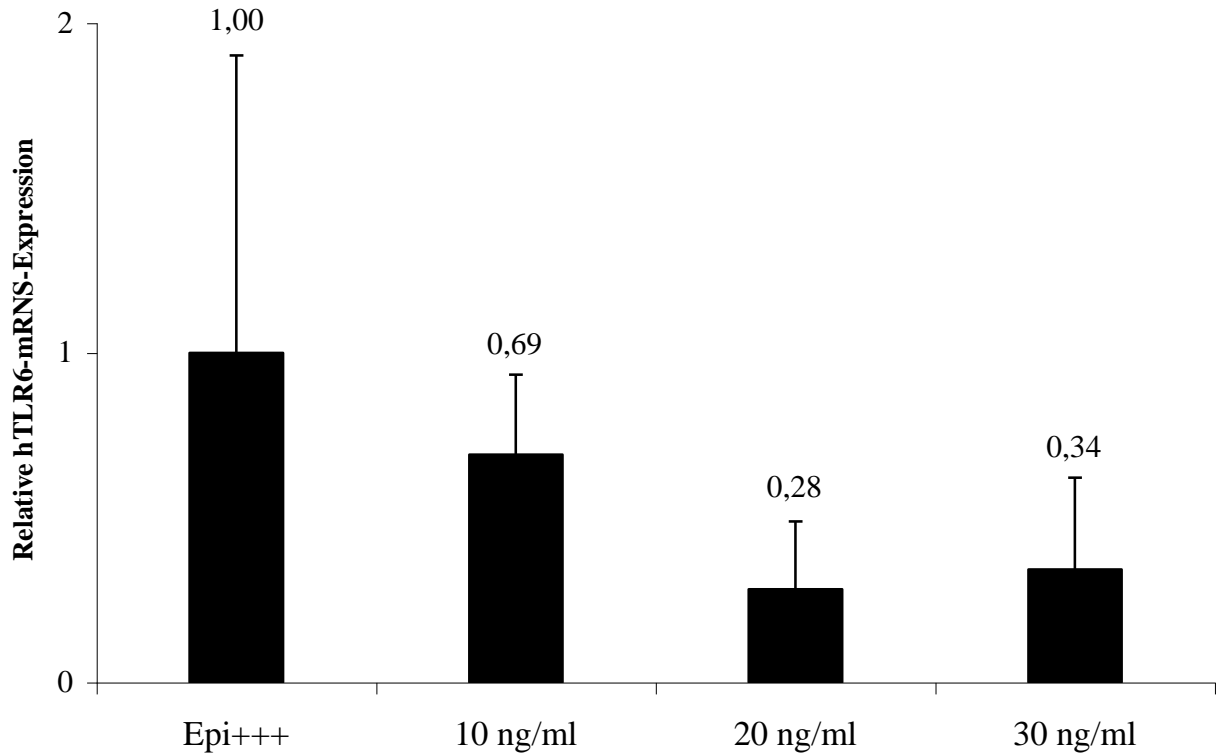


Abb. 22: Relative hTLR6-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentrationen von 10, 20 und 30 ng/ml

Abgebildet ist die relative hTLR6-mRNS-Expression bei verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwertes dar).

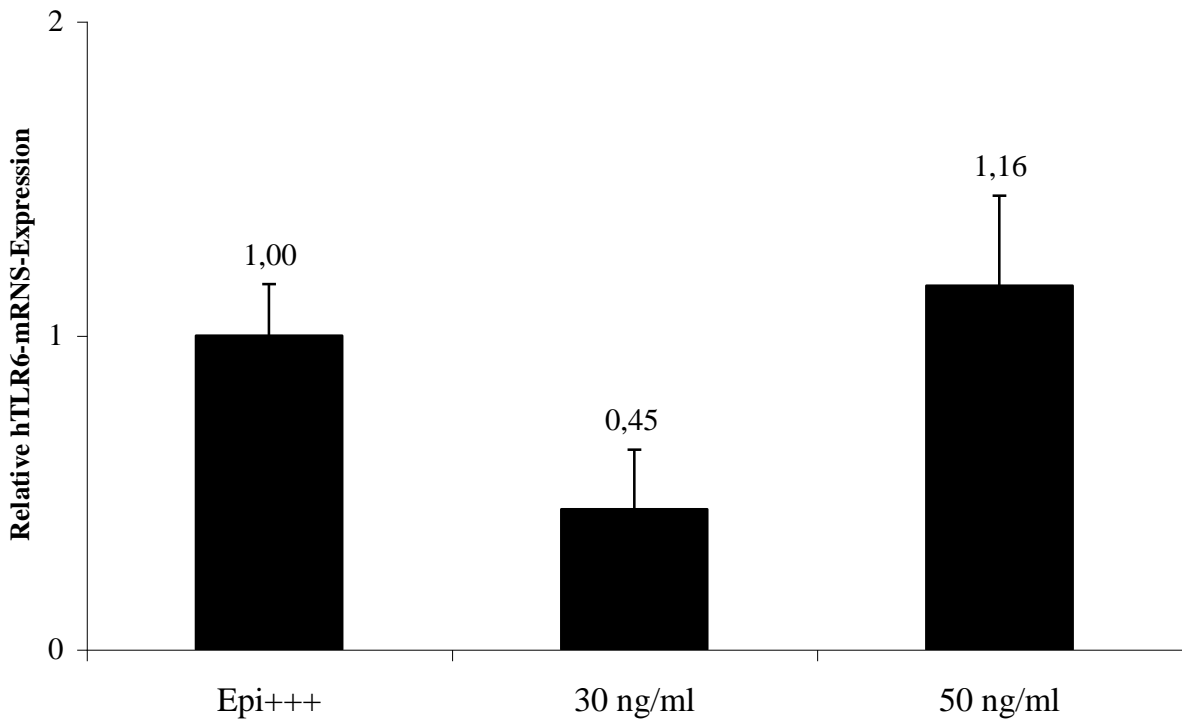


Abb. 23: Relative hTLR6-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 24h-Stimulation mit IFN- γ bei Konzentrationen von 30 und 50 ng/ml

Abgebildet ist die Expression der hTLR6-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epilife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

3.7 Zeitkinetik

Bei den vorangegangenen Versuchen konnte eine hoch signifikante mRNS-Expressionssteigerung bezogen auf den TLR 2 bei einer Konzentration von 30 ng/ml IFN- γ nachgewiesen werden, deswegen wurde die Zeitkinetik in dieser Konzentration für jeweils 8 und 16 Stunden im Epilife-Medium durchgeführt und ebenfalls für die Primer hTLR 1, 5 und 6 überprüft.

3.7.1 hTLR2-mRNS-Expression nach 8h und 16h-Stimulation von primären humanen Keratinozyten mit IFN- γ

Nach der 8-Stunden-Stimulation der primären Keratinozyten mit IFN- γ wurde eine hoch signifikante hTLR2-mRNS-Expression um das 5,92fache im Vergleich zur Kontrollprobe nachgewiesen ($p=0,00055$). Nach 16 Stunden wurde eine sehr signifikante Expression der mRNS um das 14,82fache zur Kontrolle ermittelt ($p=0,0012$) (Abb.24).

Eine Signifikanz konnte im Wiederholungsversuch nicht reproduziert werden (Abb.25).

Bei gemeinsamer statistischer Auswertung der Daten aus beiden Versuche, blieb jedoch ein statistisch signifikanter Effekt bestehen (Abb.26) (bei 8 h $p=0,025$; bei 16 h $p=0,017$).

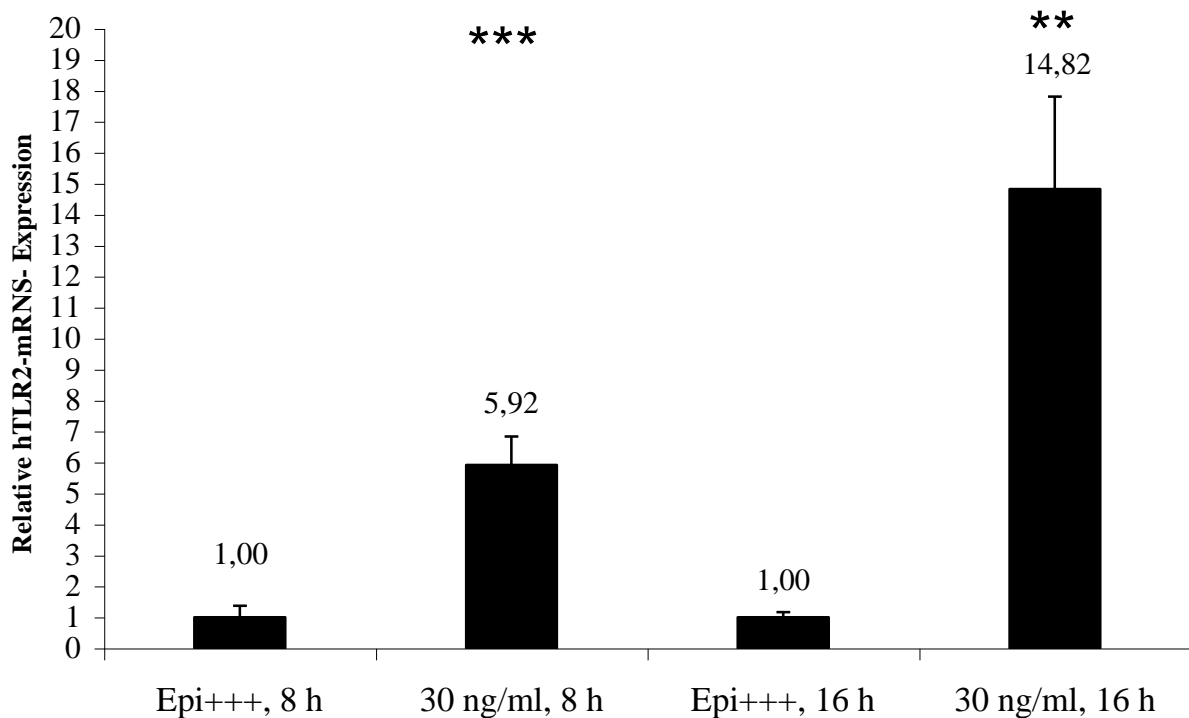


Abb. 24: Relative hTLR2-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 8h und 16h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration 30 ng/ml

Abgebildet ist die Expression der hTLR2-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epilife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

** = sehr signifikant ($p \leq 0,01$)

***= hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

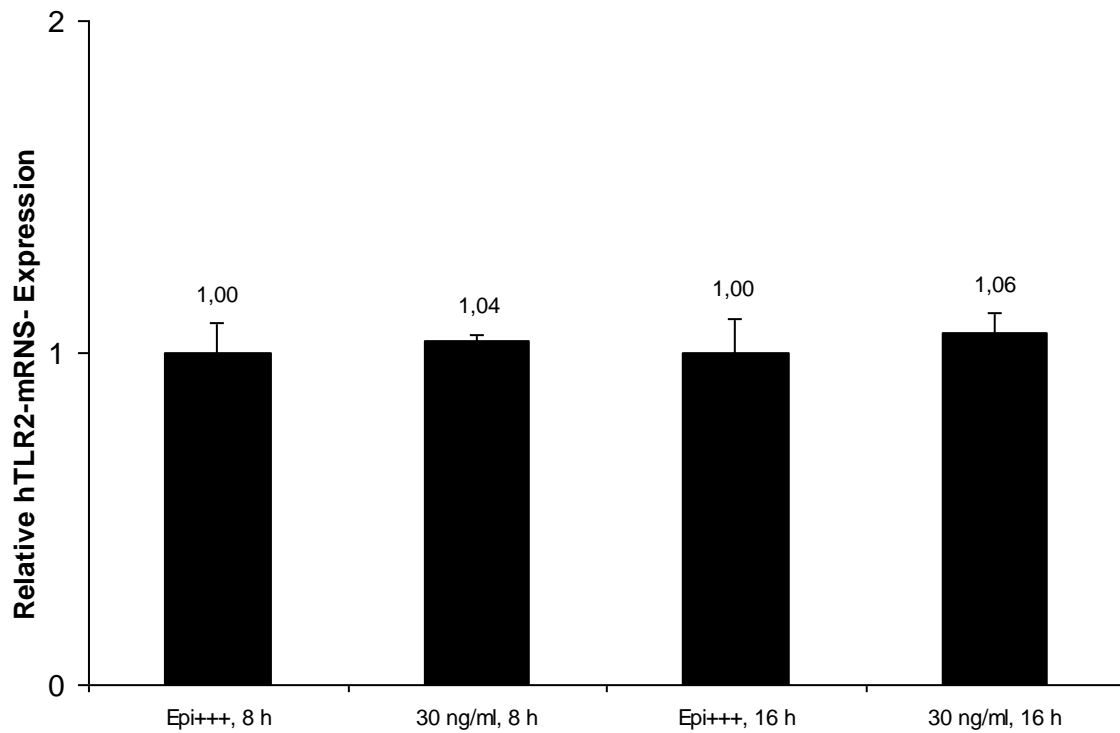


Abb. 25: Relative hTLR2-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 8h und 16h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration 30 ng/ml im Wiederholungsversuch

Abgebildet ist die Expression der hTLR2-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 4$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

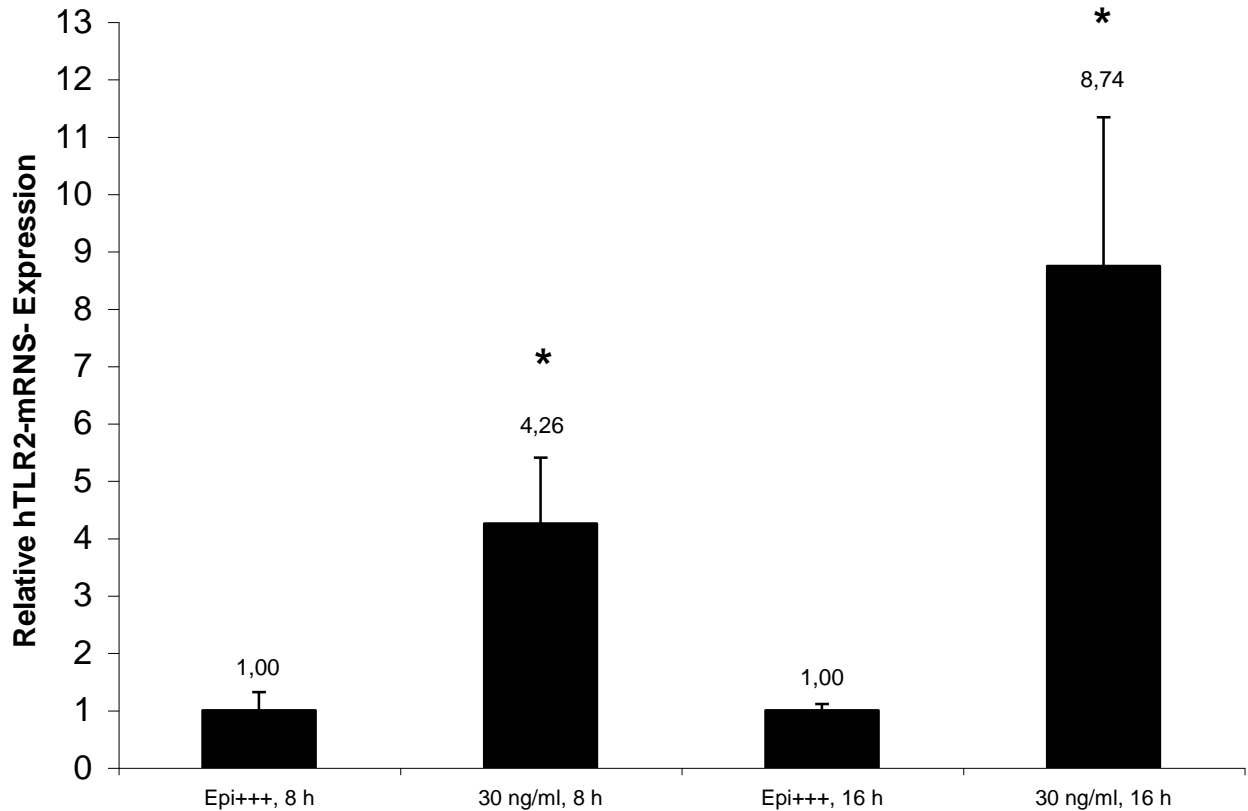


Abb. 26: Gemeinsame statistische Auswertung der beiden Versuche aus Abb. 24 und Abb.25 (8h und 16h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration 30 ng/ml)

Abgebildet ist die Expression der hTLR2-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils n = 4-6; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

3.7.2 hTLR1-mRNS-Expression nach 8h und 16h-Stimulation von primären humanen Keratinozyten mit IFN- γ

Sowohl nach 8 Stunden als auch nach 16 Stunden wurde eine nicht signifikante, minimale Verminderung der hTLR1-mRNS-Expression nachgewiesen (Abb.27).

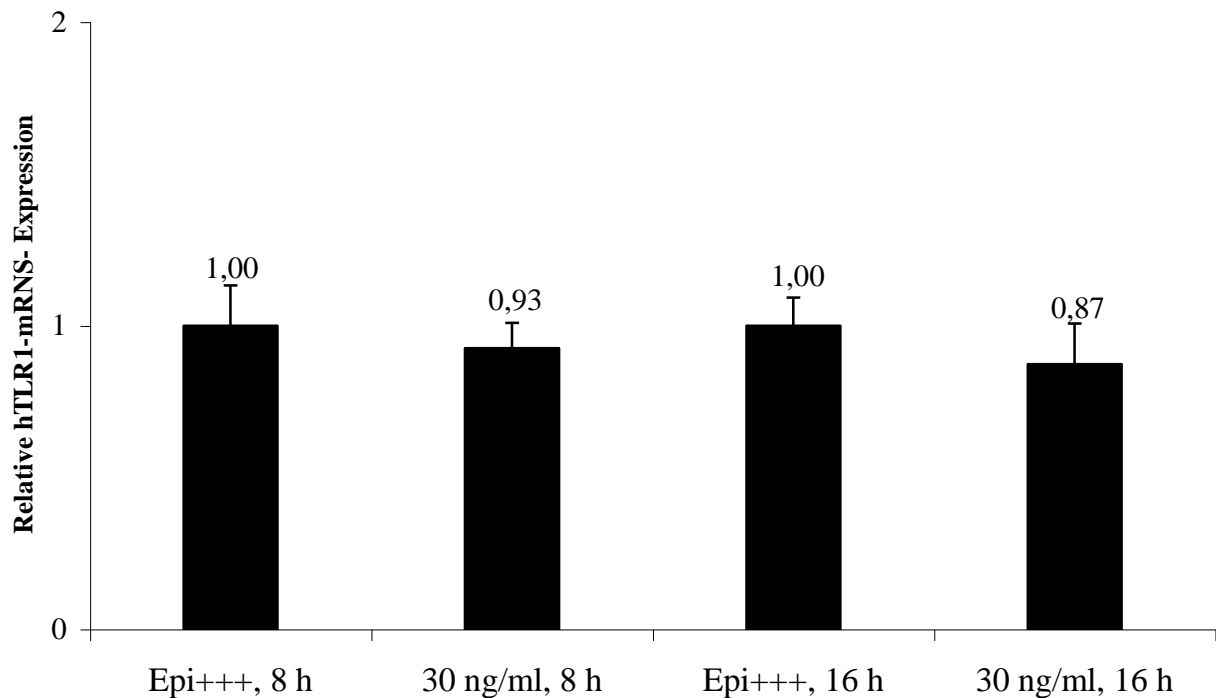


Abb. 27: Relative hTLR1-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 8h und 16h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration 30 ng/ml

Abgebildet ist die Expression der hTLR1-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

3.7.3 hTLR5-mRNS-Expression nach 8h und 16h-Stimulation von primären humanen Keratinozyten mit IFN- γ

Nach der 8-Stunden-Stimulation der primären Keratinozyten mit IFN- γ wurde eine sehr signifikante Steigerung der hTLR5-mRNS um das 2,77fache festgestellt ($p=0,0033$). Bei 16 Stunden wurde eine sehr signifikante Verminderung um das 0,55fache im Vergleich zur Kontrollprobe nachgewiesen ($p=0,0059$) (Abb. 28).

Die Signifikanz konnte im Wiederholungsversuch nicht reproduziert werden (Abb. 29). Auch bei gemeinsamer statistischer Auswertung war das Ergebnis bei der 16h-Stimulation nicht signifikant, sodass dies Ergebnis insgesamt als nicht signifikant zu bewerten ist ($p= 0,896$). Bei der 8h-Stimulation stellten wir bei gemeinsamer statistischer Auswertung eine Signifikanz fest ($p= 0,021$).

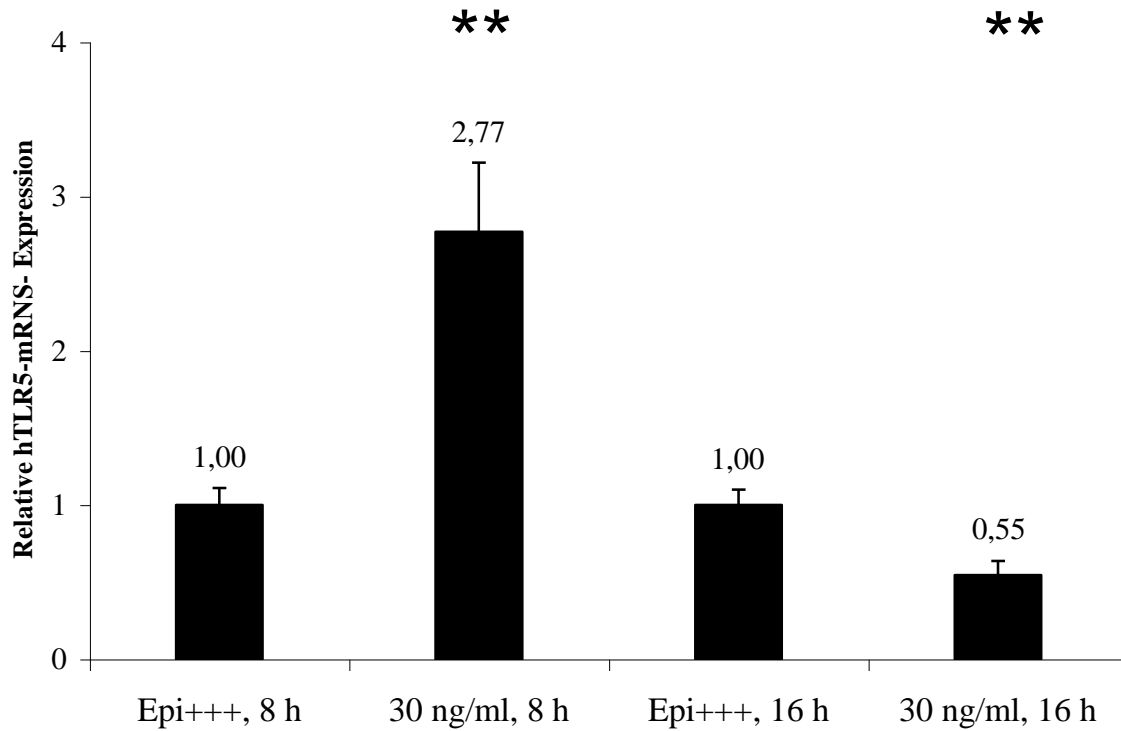


Abb. 28: Relative hTLR5-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 8h und 16h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration 30 ng/ml

Abgebildet ist die Expression der hTLR5-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epilife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde. (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar)

** = sehr signifikant ($p \leq 0,01$)

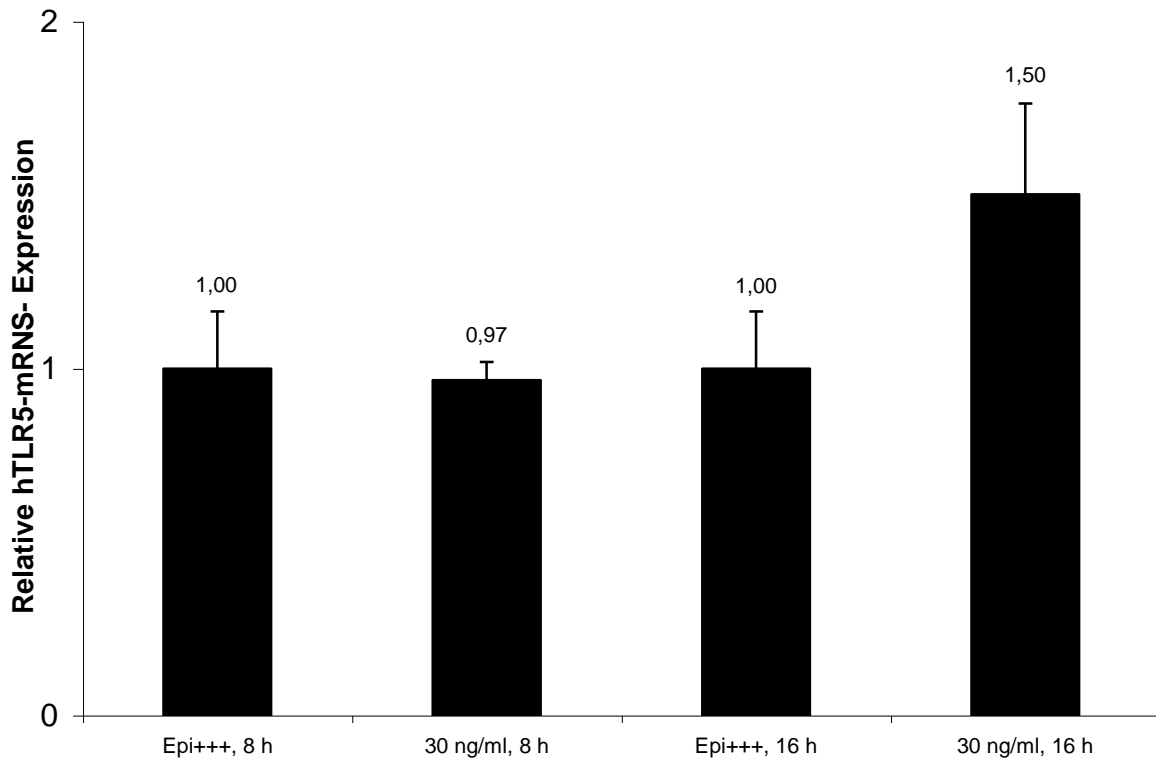


Abb. 29: Relative hTLR5-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 8h und 16h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration 30 ng/ml im Wiederholungsversuch

Abgebildet ist die Expression der hTLR5-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epilife-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde. (jeweils $n = 4$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar)

3.7.4 hTLR6-mRNS-Expression nach 8h und 16h-Stimulation von primären humanen Keratinozyten mit IFN- γ

Die hTLR6-mRNS-Expression nach 8 Stunden-Stimulation zeigte eine nicht signifikante Hochregulation der Rezeptoren-mRNS. Bei 16 Stunden dagegen wurde eine hoch signifikante Verminderung der hTLR6-mRNS um das 0,46fache nachgewiesen ($p = 0,00015$) (Abb. 30).

Die Signifikanz konnte im Wiederholungsversuch nicht reproduziert werden (Abb.31). Bei gemeinsamer statistischer Auswertung war das Ergebnis nicht signifikant, sodass das Ergebnis insgesamt als nicht signifikant zu bewerten ist (bei 8 h $p = 0,35$; bei 16 h $p = 0,502$).

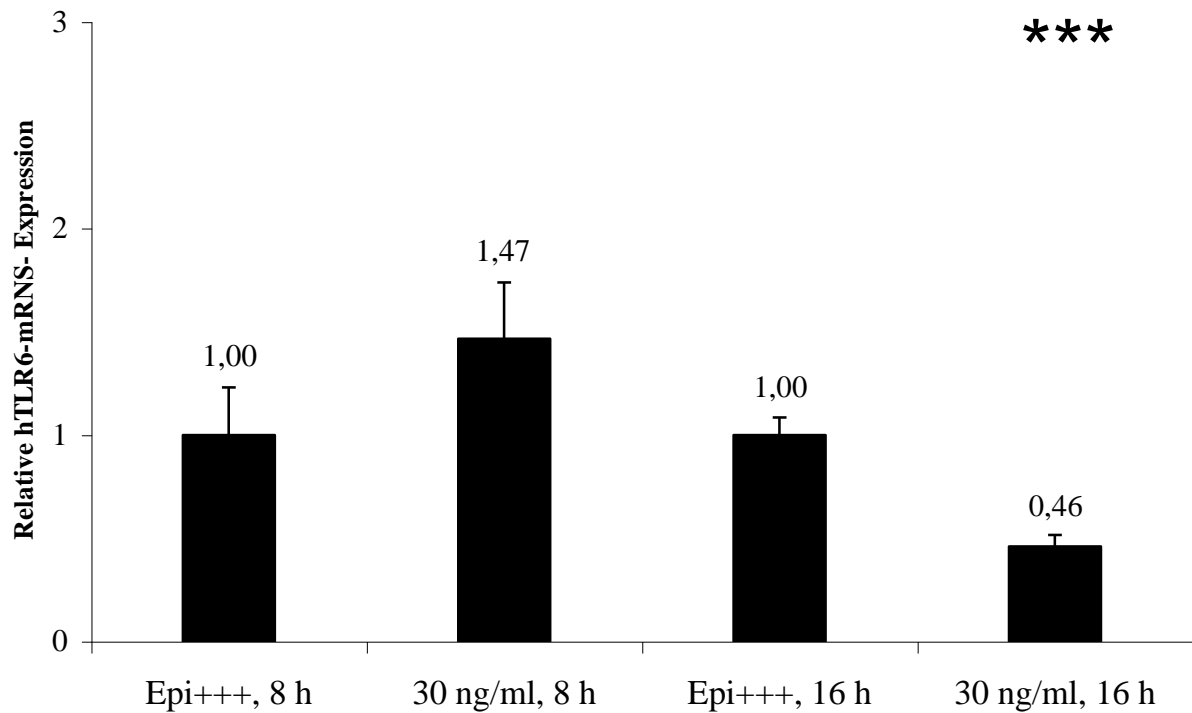


Abb. 30: Relative hTLR6-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 8h und 16h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration 30 ng/ml

Abgebildet ist die Expression der hTLR6-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 6$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

*** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

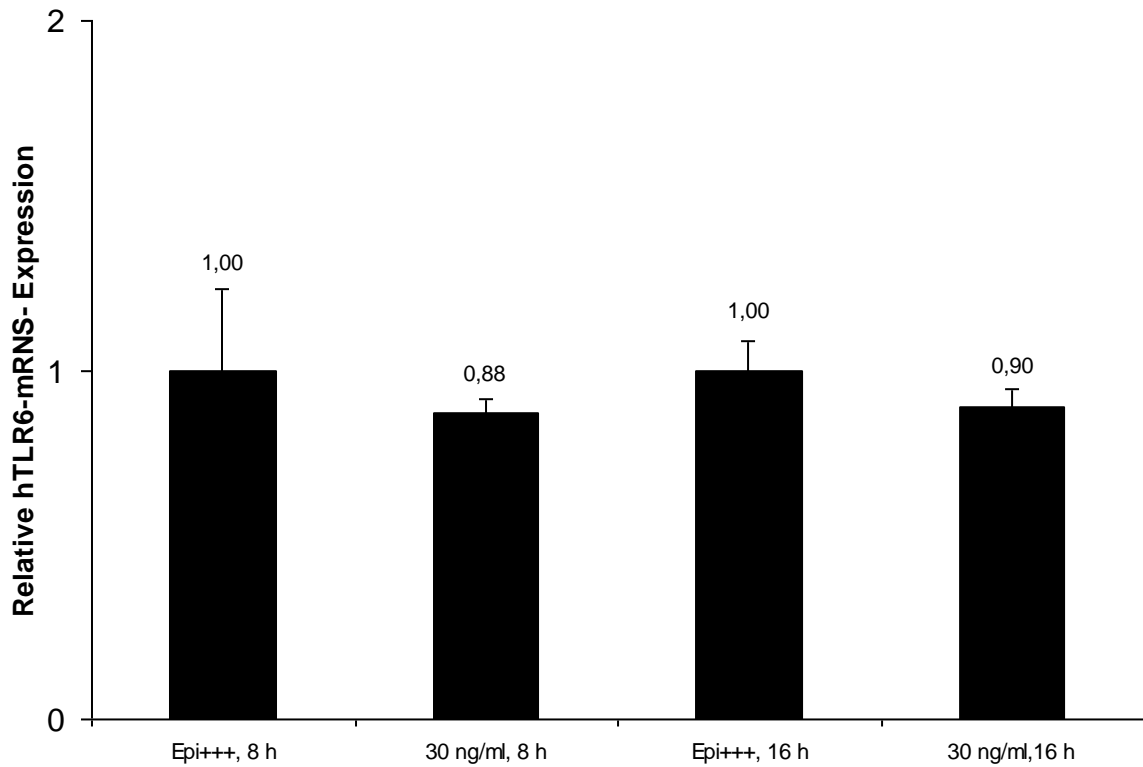


Abb. 31: Relative hTLR6-mRNS-Expression in primären Keratinozyten nach einer 8h und 16h-Stimulation mit IFN- γ der Konzentration 30 ng/ml im Wiederholungsversuch

Abgebildet ist die Expression der hTLR6-mRNS im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe (Epile-Medium), die gleich 1 gesetzt wurde (jeweils $n = 4$; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar).

4 Diskussion

Die TLR nehmen im Rahmen der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle ein, indem sie unter anderem an der Erkennung von bakteriellen Erregern beteiligt sind, die bei einigen Hauterkrankungen mit gestörter Hautbarrierefunktion, insbesondere bei der Neurodermitis, schwerwiegende Infektionen hervorrufen können. Es ist bekannt, dass Patienten mit Neurodermitis häufiger Infektionen, vor allem mit Staphylokokken und Viren (Krishna et al. 2012; Leung et al. 2011), aufweisen als Patienten mit Psoriasis. Hierbei sind u. a. der TLR 2, der zur Erkennung der grampositiven Bakterien dient, seine Heterodimerpartner TLR 1 und 6, sowie TLR 5 als Vertreter zur Erkennung flagellierter Bakterien von besonderer Bedeutung. Außerdem sind die beiden Hauterkrankungen nicht nur durch eine gestörte Hautbarriere, sondern auch durch eine unterschiedliche Expression proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet (Leung et al. 2000; Gudjonsson et al. 2004). Aufgrund des unterschiedlichen Zytokinmilieus der beiden Hauterkrankungen und der oben beschriebenen Funktion der TLR war es aufschlussreich herauszufinden, ob und wenn ja, welche inflammatorischen Zytokine die Expression von TLR in humanen Keratinozyten regulieren.

Zu Beginn unserer Versuche zeigten wir die Funktionstüchtigkeit der Primer auf, die wir mit Hilfe einer PCR und einer Agarose-Gelelektrophorese getestet hatten. Die Erzeugung eines PCR-Produktes bestätigte zunächst, dass die PCR grundsätzlich funktionierte. Die Spezifität des erzeugten PCR-Produktes konnte dadurch belegt werden, dass sich in der Gelelektrophorese die erwarteten Größen gezeigt haben. Wir konnten hiermit auch gleichzeitig die konstitutive Expression der TLR 1, 2, 5 und 6 in den humanen Keratinozyten nachweisen. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen in Bezug auf TLR 1, 2 und 5 (Mempel et al. 2003). Bezüglich der Expression des TLR 6 gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben (Mempel et al. 2003; Lebre et al. 2007). Der positive Ausfall unserer PCR bezüglich TLR 6 könnte prinzipiell auch durch eine DNA-Kontamination der mRNA-Probe verursacht sein. Allgemein lässt sich technisch eine Verfälschung des Nachweises und der Quantifizierung einer mRNA in der PCR durch DNA-Kontamination durch die Wahl intronüberspannender Primer verhindern. Dies war im Falle von TLR 6 allerdings nicht möglich, da die transkribierte Sequenz vor dem einzigen Intron des TLR-6-Gens mit 56 Basenpaaren sehr kurz war und deswegen zu wenig Möglichkeiten für die

Positionierung eines geeigneten Primers bot. Eine Kontamination mit genomischer DNA ist in unserem Fall jedoch unwahrscheinlich, da alle mRNA-Proben während der Isolierung einem DNA-Verdau unterzogen worden sind.

Für die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die konstitutive hTLR6-mRNA-Expression könnten unterschiedliche Kulturbedingungen in Frage kommen, da Mempel et al., im Gegensatz zu dem von uns verwendeten Epilife-Medium, ein Serum-free-Medium der Firma Gibco/Life Technologies, Eggenstein benutzt haben. Dagegen spricht aber, dass eine andere Arbeitsgruppe Lebre et al., die ebenfalls wie wir eine konstitutive Expression des TLR 6 nachweisen konnten, das gleiche Serum-free-Medium wie Mempel et al. verwendet haben. Desweiteren könnte die mRNA-Isolierung mit dem Trizolverfahren bei Mempel et al. im Gegensatz zu unseren Versuchen, in denen wir mit dem NucleoSpin® RNA-II-Kit gearbeitet haben, dazu geführt haben, dass die Proben für eine Proteinkontamination anfälliger waren und endogene Ribonukleasen durch Zerstörung der vorhandenen mRNA zu deren Verlust geführt haben. Allerdings sollte sich bei regulärer Durchführung des Trizolverfahrens der Einfluss gering halten.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass für die unterschiedlichen Resultate das so genannte alternative Splicing eine Rolle spielen könnte. Die Regulation des Splicingvorganges kann vom Zelltyp abhängig sein. In der Tat sind 4 Splicingvarianten für hTLR6 bekannt (vgl. Ensembl Genome Browser: ENST00000436693, ENST00000381950, ENST00000508254 und ENST00000514655). Gibt es aber in den untersuchten Zellen eventuell eine andere Splicingvariante als die erwartete, könnte dadurch, je nach Lage der benutzten Primer, in manchen Zelltypen der hTLR6-mRNA-Nachweis misslingen. Jedoch binden sowohl unsere Primer als auch die der Arbeitsgruppe Mempel an dieselben Splicingvarianten, sodass dies die unterschiedlichen Resultate nicht erklärt. Allerdings verbliebe die Möglichkeit bislang unbekannter Splicingvarianten, die zu einem Unterschied im Nachweisvermögen unserer Primer und der der Arbeitsgruppe Mempel führen könnten. Möglicherweise könnte aber auch der Differenzierungsgrad der Keratinozyten für das unterschiedliche Ergebnis verantwortlich sein. Mempel et al. verwendeten die Keratinozyten bei einer Konfluenz von 90 % für ihre Versuche. Wir hingegen sowie die Arbeitsgruppe Lebre et al. benutzten die Keratinozyten, wenn diese 70-80 % konfluent waren. Da die Keratinozyten, umso stärker ausdifferenzieren, je konfluent sie sind, und die TLR-6-Expression möglicherweise vom Differenzierungsstand abhängt, könnten die Keratinozyten

die Fähigkeit, den TLR 6 zu exprimieren, bei stärkerer Konfluenz verlieren. Dies würde dann das negative Ergebnis der Arbeitsgruppe Mempel et al. erklären.

Eine Kontamination der Zellkulturen mit anderen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten (Jang et al. 2012) oder Langerhanszellen (Mitsui et al. 2004), die TLR exprimieren, lässt sich prinzipiell nicht ausschließen. Jedoch haben wir nur solche Zellkulturen der primären Keratinozyten verwendet, die keine erkennbaren Fibroblastenanteile enthielten. Die Langerhanszellen kommen aufgrund der Kulturbedingungen nicht in Frage, da diese im Gegensatz zu humanen Keratinozyten nicht adhärent auf den zur Zellkultur verwendeten Kunststoffplatten wachsen (Schuler et al. 1985). Dadurch, dass das Kulturmedium regelmäßig gewechselt wurde, sollte diese Möglichkeit der Kontamination ausgeschlossen sein.

In unseren Vorversuchen, bei denen wir 24 h mit den Zytokinen, IL-1 β , IL-4, -5, -6, -13, -15, -17, -18, -20, -31, TGF- α , TNF- α und IFN- γ , der Konzentration 40 ng/ml die Keratinozyten stimulierten, konnten wir feststellen, dass IFN- γ eine hoch signifikante Steigerung um das 7fache der hTLR2-mRNS-Expression im Vergleich zur unstimulierten Probe in den humanen Keratinozyten bewirkte. Die Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α dominieren in psoriatischen Läsionen (Gudjonsson et al. 2004). Die Arbeitsgruppe Begon et al. 2007 hatte auf Proteinebene in gesunden humanen Keratinozyten mithilfe der Durchflusszytometrie eine Expressionssteigerung des TLR2 durch TNF- α bei 72 h nach Stimulation feststellen können. Es wäre denkbar gewesen, dass TNF- α auch eine Expressionssteigerung der TLR2-mRNS bewirken würde. Dies ließ sich jedoch in unseren Versuchen nicht nachweisen (nur 1,07fach im Vergleich zur Kontrolle). Vermutlich handelt es sich bei Begon et al. um einen posttranslationalen Effekt des TNF- α .

Bei IL-4 (1,7fach), IL-5 (1,2fach) und IL-1 β (1,7fach), konnten wir eine signifikante Steigerung feststellen. IL-4 und IL-5 werden verstärkt bei der Neurodermitis exprimiert (Brandt et al. 2011). Da die Neurodermitiker häufiger Infekte aufweisen, wäre deswegen denkbar gewesen, dass die Zytokine IL-4 und -5 eine Verminderung der TLR-2-Expression bewirken und keine Steigerung. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass aufgrund des geringen Effektes dieser von fraglicher pathophysiologischer Relevanz ist. Da IL-1 β verstärkt bei der Psoriasis exprimiert wird (Reich et al. 2002) und Psoriatiker weniger mit Infektionen zu kämpfen haben als Neurodermitiker, ist hingegen der Nachweis, dass es bei unseren

Versuchen zu einer Steigerung der TLR-2-Expression kommt, durchaus im Einklang mit unserer Hypothese. Auch hier ist allerdings die tatsächliche Relevanz des Ergebnisses wegen des geringen Effektes vorsichtig zu bewerten. Möglicherweise könnten jedoch IL-4, -5 und -1 β unter anderen Bedingungen, wenn man beispielsweise andere Konzentrationen und/oder andere Zeitpunkte wählt, stärkere oder auch entgegengesetzte Effekte hervorrufen.

Aufgrund des signifikant erhöhten Effektes, der von IFN- γ (7,7fach) ausging, wählten wir IFN- γ für die Hauptversuche aus und stimulierten die humanen Keratinozyten in den Konzentrationen von 5 bis 50 ng/ml mit diesem Zytokin. Ziel war es dabei zu ermitteln, ob die TLR-Expression konzentrationsabhängig beeinflusst werden kann und wenn ja, bei welcher Konzentration dann der maximale Effekt liegt.

Bei der niedrigsten Konzentration des IFN- γ von 5 ng/ml bei einer Stimulation von 24 h konnten wir keinen signifikanten Unterschied der hTLR2-mRNS-Expression zur unstimulierten Probe feststellen. Bei den Konzentrationen von 10 ng/ml ($p=0,0018$), 20 ng/ml ($p=0,00014$) und 30 ng/ml ($p=0,0008$) wiesen wir dann eine hoch signifikante Steigerung der hTLR2-mRNS-Expression um das 4,9fache, 5,4fache und 5fache im Vergleich zur Kontrolle nach. Der maximale Effekt bei den Konzentrationsreihen ging dann von der Stimulation mit 40 ng/ml ($p=0,00015$) aus, dabei stellten wir eine Steigerung der mRNS-Expression des hTLR 2 um das 11,3fache im Vergleich zur Kontrolle fest. Bei der Konzentration von 50 ng/ml ($p=0,00068$) des IFN- γ zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis (9,5fache Expressionssteigerung). Die gezeigten Expressionssteigerungen der hTLR2-mRNS ist konzentrationsabhängig und daher ist davon auszugehen, dass der Effekt von IFN- γ stammt und nicht durch eine Kontamination verursacht wurde.

Um Auswirkungen auf die TLR-mRNS-Expression zu anderen Zeitpunkten zu berücksichtigen, führten wir zusätzlich bei jedem unserer TLR eine Zeitkinetik mit IFN- γ durch. Wir wählten die Zeitpunkte 8 und 16 h aus, um enger über den 24-h-Zeitraum verteilt den Effekt von IFN- γ zu erfassen. Wir stimulierten die Keratinozyten mit der Konzentration (30 ng/ml), bei der der Effekt in den Hauptversuchen, eben bei TLR 2, am größten war. Es ergab sich bei 8 h eine hoch signifikante Expressionssteigerung der TLR2-mRNS ($p=0,00055$) und zwar um das 5,9fache im Vergleich zur Kontrolle. Wie oben beschrieben, sahen wir auch zuvor schon ähnliche Effekte bei den Konzentrationen von 10 bis 30 ng/ml bei einer 24 h-Stimulation. Der maximale Effekt von allen Versuchen zeigte sich aber bei 16 h

und zwar haben wir bei diesem Zeitpunkt eine sehr signifikante 14,8fache TLR2-mRNS-Expressionssteigerung ($p=0,0012$) gemessen. Dass sich der Effekt bereits nach 8 h nachweisen lässt, deutet darauf hin, dass dieser vermutlich unmittelbar durch das IFN- γ ausgelöst wird und nicht über weitere zwischengeschaltete Mediatoren bewirkt wird. Der maximale Effekt auf die mRNS-Expression scheint sich um die 16 h nach Stimulationsbeginn zu zeigen. Wobei es auch denkbar wäre, dass bei den anderen Konzentrationen (z.B. bei 40 ng/ml des IFN- γ) bei 8 und 16 h noch stärkere Effekte erzielt werden könnten.

Die von uns ermittelten Effekte auf mRNS-Ebene bestätigen die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe, die die Auswirkung von IFN- γ auf die TLR-2-Expression auf der Proteinebene untersucht hatten (Begon et al. 2007). Diese konnten eine Steigerung der intrazytoplasmatischen Expression von TLR 2 mit einem Maximum bei 72 h nach Stimulation nachweisen.

Allerdings sind grundlegende Unterschiede zwischen unseren Versuchen und der Arbeitsgruppe Begon et al. 2007 vorhanden. Begon et al. hatten eine Durchflusszytometrie als Untersuchungsmethode gewählt, die zur Quantifizierung von Expressionsunterschieden sicherlich nicht so gut geeignet ist wie ein ELISA oder auch eine RT-PCR. Außerdem ist ein bei der Durchflusszytometrie verwendeter Antikörper weniger spezifisch als eine Primerbindung mit Größenkontrolle des PCR-Produktes, zumal Begon et al. 2007 einen polyklonalen Antikörper verwendeten. Da Begon et al. sich auf die Bestimmung der intrazellulären und extrazellulären Proteinexpression beschränkt, lässt sich aus deren Daten nicht erkennen, ob die nachgewiesene Expressionssteigerung der TLR-2-mRNS auf einer Steigerung der Genexpression beruht oder z. B. durch posttranslationale Effekte (verringertes Proteinabbau, schnellerer Transport auf die Zelloberfläche) entsteht. Durch unsere Ergebnisse lässt sich nun sehr wahrscheinlich sagen, dass eine Steigerung der Genexpression zu einem erheblichen Anteil für die Expressionssteigerung des TLR2 verantwortlich ist.

Weitere Unterschiede zwischen der Arbeitsgruppe Begon et al. und unseren Versuchen ist die Auswahl der Konzentrationen des IFN- γ zur Stimulation der Keratinozyten. Die gewählten Konzentrationen der Arbeitsgruppe Begon et al. 2007 von 10 IU/mL bis 1000 IU/mL sind mit unseren Konzentrationen schwer vergleichbar, da die Angaben zur Umrechnung in $\mu\text{g/ml}$ uneinheitlich sind. Außerdem lag der Zeitpunkt bei der Stimulation mit IFN- γ bei Begon et al. zu einem späteren Zeitpunkt (72 h).

Interessant ist auch, dass zuvor eine andere Arbeitsgruppe Pivarcsi et al. im Jahr 2003 auf der mRNA-Ebene untersucht hatte, dass eine Stimulation mit 10 ng/ml IFN- γ zusammen mit 500 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS), dem exogenen Liganden des TLR 2, zu verschiedenen Zeitpunkten (0,3,6,12 und 24h) gemessen, eine Expressionssteigerung der hTLR2-mRNA induziert. Hier könnte man aber vermuten, dass der Effekt vor allem auf dem LPS beruhte, denn LPS allein bewirkte eine Expressionssteigerung in den Versuchen dieser Arbeitsgruppe (Pivarcsi et al. 2003).

Aus unseren Daten ist deutlich ersichtlich, dass eine Stimulation allein mit IFN- γ einen Effekt auf die Expressionssteigerung der humanen TLR 2-mRNA hat. Weil IFN- γ bei der Psoriasis einen bedeutenden Platz einnimmt (Gudjonsson et al. 2004), liegt die Vermutung nahe, dass durch das Mobilisieren des Immunsystems, in diesem Falle des TLR 2, die Psoriatiker eine frühzeitige Erkennung von Mikroorganismen, wie *Staphylococcus aureus*, haben und daher schneller mit Infektionen der grampositiven Bakterien sich auseinandersetzen können. Auch dafür spricht eine Untersuchung der Arbeitsgruppe Baker et al. 2003, die durch immunhistologische Färbungen in psoriatischen Läsionen herausgefunden haben, dass TLR 2 sehr stark auf den humanen Keratinozyten in den oberen Schichten der Epidermis exprimiert wird. Diese äußerten schon die Vermutung, dass TLR 2 allgemein „entweder durch die Anwesenheit von grampositiven Bakterien auf der Hautschicht präsent ist oder als Ergebnis durch die Effekte von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IFN- γ .“ (Baker et al. 2003) heraufreguliert wird.

In der akuten Phase der Neurodermitis spielt IFN- γ keine Rolle. Die IFN- γ -Antwort wird sogar durch die Th2-Zytokine, wie IL-4 und IL-13, gehemmt und daher wird eine Abwehr durch die zum angeborenen Immunsystem gehörenden β -Defensine, HBD-2 und HBD-3, verhindert (Nomura et al. 2003). Durch den durch unsere Daten gezeigten fehlenden Einfluss des IFN- γ auch auf den rezeptiven Anteil des angeborenen Immunsystems und somit durch eine fehlende Hochregulation des TLR 2 könnte die Erkennung von Pathogenen gar nicht oder verspätet auftreten. All diese Mechanismen zusammen könnten unter Umständen es den Bakterien möglich machen sich auf neurodermitischer Haut besonders gut zu vermehren.

Den Einfluss des IFN- γ auf den TLR 2 in anderen Zellen hatte schon im Jahr 2001 die Arbeitsgruppe Mita et al. untersucht, die mithilfe der Durchflusszytometrie zeigten, dass die

Expression von TLR 2 auf humanen Monozyten durch IFN- γ konzentrationsabhängig (20 bis 2000 U/ml) und zeitabhängig (3 bis 5 Tage) hochreguliert wird.

Auch 2002 konnte die Arbeitsgruppe Wolfs et al. mithilfe der RT-PCR in renalen Epithelien von Mäusen in vivo aufzeigen, dass die Expression der TLR-2-mRNS in Abhängigkeit von einer ischämiebedingten IFN- γ - und TNF- α -Ausschüttung nach 3 und 5 Tagen eine signifikante Steigerung zu verzeichnen hatte.

Zusätzlich untersuchten wir die Heterodimerpartner des TLR 2, den TLR 1 (erkennt Triacyllipopeptiden der Bakterien) und TLR 6 (Diacyllipopeptide), und deren Induzierbarkeit. Auch hier führten wir zunächst einen Vorversuch durch, in dem wir mit verschiedenen Zytokinen der Konzentration 40 ng/ml von 24h Dauer testeten. Es zeigte sich keine signifikante Expressionsveränderung sowohl des TLR 1 als auch des TLR 6 durch die Zytokine. Fast alle Zytokine bewirkten entweder nur eine minimale Expressionssteigerung (IL-4, -5, -17, -18, TNF- α , TGF- α) oder Expressionsverminderung (IL-1 β , IL-6, -13, -20, -31) der TLR1-mRNS. Diese erreichte zudem auch durchgängig kein signifikantes Niveau.

Bei der TLR6-mRNS-Expression konnte ähnlich TLR 1 teils eine minimale Expressionssteigerung (IL-4, -5, -17, -18, TNF- α , TGF- α) und teils eine minimale Expressionsminderung (IL-1 β , -6, -13, -20, -31) ohne Signifikanz beobachtet werden,

Interessant ist aber, dass das IL-15 als einziges Zytokin in dieser Reihe eine 3,8fache TLR1-mRNS-Expressionssteigerung bzw. eine sogar 10,5fache TLR6-mRNS-Expressionssteigerung bewirkte, aber ebenfalls ohne Signifikanz. Man weiß, dass IL-15 vermehrt in psoriatischen Läsionen vorkommt (Elder 2007), also könnte es sein, dass eventuell bei anderen Konzentrationen oder Zeitpunkten eine signifikante Steigerung hervorgerufen werden könnte. Auch eine Erhöhung der n-Zahl könnte hier einen signifikanten Effekt aufdecken. Auch in Bezug auf IFN- γ reagierten die beiden TLR ähnlich, denn es fand keine Expressionsveränderung der mRNS sowohl des TLR 1 (0,9fach) als auch des TLR 6 (0,7fach) statt. Da wir zuvor herausgefunden haben, dass IFN- γ TLR 2 heraufreguliert und seine Heterodimerpartner kaum einer Veränderung unterliegen, könnte man hier vermuten, dass TLR 2 per se eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Bakterien einnimmt, indem offensichtlich die Regulation der Detektion durch TLR im Wesentlichen über TLR 2 beeinflusst wird.

Um die Induktion durch IFN- γ auch bei TLR 1 und 6 bei anderen Konzentrationen zu testen, stimulierten wir auch hier die humanen Keratinozyten 24 h lang nur mit IFN- γ der Konzentration von 5 bis 50 ng/ml. Es ergab sich keine signifikante Veränderung auf die TLR1-mRNS-Expression durch das Zytokin. Zwar haben wir bei der höchsten Konzentration von 50 ng/ml eine signifikante Expressionssteigerung um das 3,4fache im Vergleich zur Kontrolle gemessen, da aber bei dem Reproduktionsversuch die Signifikanz nicht nachgewiesen werden konnte, ist diese eher mit Vorsicht zu bewerten. Allerdings könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass bei höheren Konzentrationen des IFN- γ sich signifikante Expressionssteigerungen hervorrufen lassen.

IFN- γ hat vermutlich keine Auswirkungen auf den TLR 6, denn aus unseren Daten ergab sich keine signifikante Expressionsveränderung der TLR6-mRNS bei irgendeiner der Konzentrationen. Bei den Ergebnissen ist aber tendenziell bei fast allen Konzentrationen, außer bei 50 ng/ml, eine Expressionsminderung der TLR6-mRNS zu verzeichnen, aber ohne signifikante Effekte.

Bei der Zeitkinetik der Heterodimerpartner des TLR 2 konnte sowohl bei TLR 1 als auch zum Teil bei TLR 6 keine Expressionsveränderung der mRNS zu den verschiedenen Zeitpunkten festgestellt werden, auch wenn TLR 6 bei 16 h eine hoch signifikante Expressionsverminderung der mRNS auf das 0,5fache ($p=0,00015$) zeigte. Die Arbeitsgruppe Baker et al. stellte in den immunhistologischen Färbungen fest, dass in der Epidermis von Psoriatikern nur in den oberen Zellschichten eine Expression des TLR 1 vorhanden ist, nicht aber in der Haut gesunder Patienten. Also wäre es möglich gewesen, dass unter dem Einfluss des IFN- γ , welches ja verstärkt bei der Psoriasis ausgeschüttet wird, der TLR 1 heraufreguliert wird. Bei unseren Versuchen konnten wir dies so nicht nachweisen.

Außerdem testeten wir durch Stimulation der Keratinozyten mit verschiedenen Zytokinen die mRNS-Expression des TLR 5, der begeißelte Bakterien erkennen kann. Somit wurde ein weiterer wichtiger Anteil der Erregerdetektion erfasst. Die meisten Zytokine, wie IL-1 β , -6, -13, -4, IFN- γ und TNF- α , haben eine Expressionsminderung der TLR5-mRNS bewirkt, die restlichen Zytokine (IL-17, -18, -20, -31, TGF- α) veränderten kaum die Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die Arbeitsgruppe Miller et al. (2005) hatte bei ihren Versuchen mithilfe von immunhistologischen Färbungen festgestellt, dass durch den Einfluss des

Zytokins TNF- α der TLR 5 verstärkt in der basalen Zellschicht exprimiert wird. Aufgrunddessen wäre es möglich gewesen, dass man statt einer Expressionsminderung der mRNA eine Expressionssteigerung des TLR 5 in unseren Versuchen sieht. Da Miller et al. aber die humanen Keratinozyten an einer Luft-Flüssigkeits-Grenze (Lifted Culture) kultivierten, könnten die Ergebnisse auch durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen anders ausgefallen sein, da sich einer derartigen Kultur eine epidermisartige Schichtung mit einem Nebeneinander unterschiedlicher Keratinozyten-Differenzierungsstadien ergibt.

Wir konnten beobachten, dass durch das IL-5 zwar eine signifikante TLR5-mRNA-Expressionssteigerung um das 1,5fache hervorgerufen wird. Aber durch den geringen Effekt muss dies zunächst mit Vorsicht bewertet werden, umso mehr, als über die Rolle des IL-5 zum Beitrag der klinischen Symptomatik der Neurodermitis noch diskutiert wird (Brandt, 2011). Ähnlich wie bei TLR 1 und TLR 6, hatte IL-15 die stärkste TLR5-mRNA-Expressionssteigerung (3,8fach) von allen Zytokinen hervorgerufen. Möglicherweise hat IL-15 bei allen drei TLR einen gewissen Einfluss auf die Expression und könnte eben unter anderen Bedingungen bezüglich der Zeit und Konzentration eventuell auch stärkere oder auch entgegengesetzte Effekte hervorrufen.

Bei den Konzentrationsreihen (24 h, 5 bis 50 ng/ml des IFN- γ) für TLR 5 konnten wir bei der Konzentration von 30 ng/ml eine signifikante Expressionsminderung (0,7fache) beobachten. Trotz des signifikant ausgefallenen Ergebnisses ist dieses fragwürdig, da bei einer Wiederholung des Versuches keine Signifikanz erhalten werden konnte. Ansonsten hatten wir tendenziell eine Verminderung der TLR5-mRNA-Expression gemessen, aber ohne signifikante Effekte.

Für die Zeitkinetikreihe bei TLR 5 waren die Ergebnisse widersprüchlich: bei 8h wurde eine sehr signifikante Expressionssteigerung der mRNA gemessen um das 2,8fache im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,0033$) und bei 16h wiederum war eine sehr signifikante Expressionsminderung um das 0,6fache ($p=0,0059$) nachweisbar, ähnlich wie bei 24 h. Dieses Ergebnis könnte dazu passen, dass TLR 5 bei immunhistologischen Färbungen in den basalen Keratinozyten bei Psoriatikern herunterreguliert wird (Baker et al. 2003). Aufgrund dieser uneinheitlichen Resultate und auch der Tatsache, dass bei der 24-h-Stimulationen bei 50 ng/ml die Expressionsminderung nicht mehr nachweisbar war, lässt sich der Effekt von IFN- γ auf die TLR-5-mRNA-Expression aus den vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilen.

Insgesamt betrachtet, ergeben sich bei allen drei TLR 1, 5 und 6 keine signifikanten Expressionsveränderungen der TLR-mRNS-Expression im untersuchten Konzentrationsbereich und zu den untersuchten Zeitpunkten. Infolgedessen liegt aus unseren Daten die Vermutung nahe, dass TLR 2 die zentrale Rolle bei der Erkennung von Bakterien übernimmt, da die mRNS-Expression des TLR 2 vorrangig einer Zytokinregulation zu unterliegen scheint.

Zur Sicherung der Ergebnisse könnte man mit den von uns verwendeten Konzentrationen des IFN- γ die TLR-mRNS-Expression auf Proteinebene untersuchen. Diese Untersuchungen sollten durch einen ELISA erfolgen, da die Quantifizierung der Proteinexpression dadurch am besten zu erreichen ist, möglichst unter Kontrolle der Spezifität durch einen Westernblot.

Außerdem könnte man aus unserer getesteten Zytokinreihe ein Zytokin auswählen und einen Versuch mit Konzentrationsreihen und Zeitkinetik durchführen. Dafür käme zunächst IL-15 in Frage, da es bei TLR 1 (3,8fach), TLR 5 (3,8fach) und TLR 6 (10,5fach) um ein Vielfaches im Vergleich zur Kontrolle zu einer Expressionssteigerung geführt hat. Da bei uns bei der Testung der Zytokine keine signifikanten Effekte zu verzeichnen waren, wäre es aber denkbar, dass bei näherer Untersuchung signifikante Resultate möglich wären. Auch IL-1 β wäre dafür geeignet, zumindest kam es bei unseren Versuchen zur signifikanten TLR2-mRNS-Expressionssteigerung um das 1,73fache.

Auch würden andere Zytokine, die wir nicht untersucht haben, zur Stimulation von humanen Keratinozyten in Frage kommen und damit ihre Auswirkungen auf die TLR-Expression untersucht werden. Hier kämen z.B. IL-28 und IL-29 in Betracht, da eine Hochregulation des TLR 2 durch diese in Keratinozyten nachgewiesen wurde (Wolk et al 2010). Von daher wäre es auch sinnvoll auszuprobieren, wie sich die beiden genannten Zytokine auf die Heterodimerpartner TLR 1 und 6 auswirken. Zytokine wie IL-19 (Tüzün et al. 2007), IL-10 oder IL-3, die in psoriatischer Haut exprimiert werden, wären auch zur weiteren Untersuchung geeignet.

Außerdem kommen auch Kombinationen von Zytokinen in Frage. Für die Psoriasis wichtigen Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α , könnte man kombinieren oder die bei der Neurodermitis stark exprimierten Zytokine IL-4 und IL-13 wären eine mögliche Kombination.

Es ist bekannt, dass bei der Neurodermitis gehäuft Herpes-simplex-Viren und Molluscum contagiosum auftreten. Diese Erkrankungen werden durch doppelsträngige DNA-Viren ausgelöst. Infolgedessen könnte man die Expression des TLR 9, der zur Erkennung von

pathogentypischer hypomethylierter DNA an unmethylierten CpG Motiven (Miller et al. 2008) dient, unter dem Einfluss Neurodermitis-typischer Zytokine untersuchen. Ansonsten könnte auch die Induktion des TLR 4 untersucht werden mit ausgewählten Zytokinen, da beispielsweise eine Expressionssteigerung der mRNA von der Arbeitsgruppe Pivarcsi et al. 2003 durch IFN- γ zusammen mit LPS nachgewiesen wurde.

Ferner könnte man von Neurodermitikern oder Psoriatikern Hautproben in den Läsionen entnehmen und mithilfe der PCR die mRNA-Expression der TLR in diesen Proben untersuchen sowie die Proteinexpression per ELISA messen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in den humanen Keratinozyten nicht nur die TLR 1, 2, 5 und 6 konstitutiv exprimiert werden. Der TLR 2 unterliegt einer Induktion durch das IFN- γ . Wir konnten aufzeigen, dass die signifikanten Ergebnisse des TLR 2 konzentrationsabhängig sind und sich sehr wahrscheinlich um direkte Zytokineffekte handelt. Bei TLR 1, 5 und 6 ließ sich mit den getesteten Zytokinen keine Induktion nachweisen.

5 Zusammenfassung

Die Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind im Rahmen des angeborenen Immunsystems essenziell für die Erkennung von pathogenen Erregern. Keratinozyten exprimieren konstitutiv die TLR 1, 2, 3, 5 und 9. Manche Autoren geben auch zusätzlich TLR 4 und 6 an. Die Hauterkrankungen Neurodermitis oder Psoriasis gehen mit einer gestörten Hautbarriere einher und sind gekennzeichnet durch eine unterschiedlich ausgeprägte Expression proinflammatorischer Zytokine. Zudem neigt neurodermitische Haut besonders zu Infektionen, was durch die gestörte Hautbarriere begünstigt wird. Trotz ebenfalls gestörter Barriere ist die Hautinfektionsrate bei Psoriasis nicht erhöht. Diese unterschiedliche Infektionsneigung wird u. a. mit Expressionsunterschieden von Proteinen der angeborenen Immunität erklärt, für die wiederum das unterschiedliche Zytokinmilieu verantwortlich sein könnte.

Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, welche proinflammatorischen Zytokine ausgewählte TLR auf der mRNA-Ebene in humanen Keratinozyten induzieren können. Dazu wählten wir TLR 2, der grampositive Bakterien erkennt, seine Heterodimerpartner TLR 1 und 6, und TLR 5, als Vertreter der Erkennung begeißelter Bakterien.

Primäre humane Keratinozyten wurden zunächst mit den Zytokinen Interleukin (IL)-1 β , IL-4, -5, -6, -13, -15, -17, -18, -20, -31, TGF- α , TNF- α , Interferon γ (IFN- γ) stimuliert und die mRNA-Expression der TLR mittels einer Realtime-PCR semiquantitativ untersucht. Hierbei zeigte sich ein hoch signifikanter Effekt durch Stimulation mit IFN- γ , insbesondere auf die TLR-2-mRNA-Expression. Stimulationen mit den anderen genannten Zytokinen ergaben entweder keine signifikanten Induktionen oder waren widersprüchlich.

Anschließend wurde der Einfluss des IFN- γ auf die vier ausgewählten TLR in einer Konzentrationsreihe (5 bis 50 ng/ml bei 24h) und einer Zeitreihe (zusätzlich 8 und 16h bei einer Konzentration von 30ng/ml) genauer untersucht. Auch hier zeigte sich ein hoch signifikanter Effekt ausgehend von IFN- γ auf die TLR-2-mRNA-Expression bei verschiedenen Konzentrationen bei 24 h und der maximale Effekt zeigte sich nach 16 h bei einer Konzentration von 30 ng/ml. Bei den Heterodimerpartnern TLR 1 und 6 ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression sowohl in der Konzentrationsreihe, als auch in der Zeitreihe. Bezüglich der TLR 5-Expression ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse nach Stimulation mit IFN- γ .

Die Arbeit zeigt, dass TLR 1, 2, 5 und 6 auf den humanen Keratinozyten konstitutiv exprimiert werden und TLR 2 einer Induktion durch das Zytokin IFN- γ auf der mRNA-Ebene unterliegt. Die Wertigkeit der Ergebnisse bezüglich TLR 2 wird durch die Abhängigkeit des Effekts von der Konzentration des IFN- γ wesentlich gestützt. Bei den TLR 1, 5 und 6 konnte keine signifikante Induktion durch die getesteten Zytokine nachgewiesen werden. Insgesamt legen meine Ergebnisse eine zentrale Rolle von TLR 2 in der Regulation der Erkennung pathogener Organismen in der menschlichen Haut nah.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
cDNA	deutsch für cDNA, „komplementäre DNA“
CpG-Motiv	Cytosin-Phosphatbrücken-Guanosin-Motiv
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetales Kälberserum (foetal calf serum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hGAPDH	humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hTLR	humaner TLR
IL	Interleukin
mRNS	deutsch für mRNS, „Boten-RNS“
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene
Oligo-dT	Desoxythymidin-Oligonukleotide
OSMR	Oncostatin M-Rezeptor
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern)
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PPR	Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors)
RNS	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
TGF- α	transformierender Wachstumsfaktor α (transforming growth factor α)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α (tumor necrosis factor α)
TLR	TLR

7 Literaturverzeichnis

1. **Baker** B.S., Ovigne J-M., Powles A.V., Corcoran S., Fry L. (2003): Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*, 148, S.670–679
2. **Barker** J. (1998): Psoriasis as a T-cell-mediated autoimmune disease. *Hospital Medicine*, 59, S.530-533
3. **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, S.497-506.
4. **Brandt** E.B., Sivaprasad U. (2011): Th2 cytokines and atopic dermatitis. *J Clin Cell Immunol*, 2 S.1-48
5. **Breuer** K., Werfel T., Kapp A.(2006): Allergic manifestations of skin diseases- atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy*, 91, S.76-86
6. **Christophers** E., Henseler T. (1987): Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*, 279,S48-51.
7. **Christophers** E. (1996): The Immunopathology of Psoriasis. *Int Arch Allergy Immunol*, 110, S.199-206
8. **Elder** J.T. (2007): IL-15 and Psoriasis: another genetic link to Th17?. *J Invest Dermatol*, 127, S. 2495–2497
9. **Gottlieb** A.B. (1990): Immunologic mechanisms in psoriasis. *Invest Dermatol*, 95, S.18-19

-
10. **Gröne A.** (2002): Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*, 88, S. 1-12
 11. **Gudjonsson J.E., Johnston A., Sigmundsdottir H., Valdimarsson** (2004): Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol*, 135, S.1-8
 12. **Hamid Q., Boguniewicz M., Leung D.Y.** (1994): Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest*, 94, S.870-876.
 13. **Hänel K.H., Cornelissen C., Lüscher B., Baron J.M.** (2013): Cytokines and the skin barrier. *Int J Mol Sci*, 14, S. 6720-6745.
 14. **Harder J., Dressel S., Wittersheim M., Cordes J., Meyer-Hoffert U., Mrowietz U., Fölster-Holst R., Proksch E., Schröder J-M., Schwarz T., Gläser R.** (2010): Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *J Invest Dermatol*, 130, S.1355-1364
 15. **Harder J., Bartels J., Christophers E., Schröder JM** (1997): A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, S. 861
 16. **Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M., Aderem A.** (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, S.1099-1103
 17. **Hedayat M., Kiyoshi Takeda K., Rezaei N.** (2012): Prophylactic and therapeutic implications of Toll-like receptor ligands. *Med Res Rev*, 32, S.294-325
 18. **Higashiyama M., Hashimoto K., Matsumoto K., Yoshikawa K.** (1994): Differential expression of transforming growth factor- α (TGF- α) and EGF receptor in transitional area of psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci*, 7, S.45-53

-
19. **Jang S.**, Park J-S., Won Y-H., Yun S-J., Kim S-J. (2012): The expression of Toll-like receptors (TLRs) in cultured human skin fibroblast is modulated by histamine. *Chonnam Med J*, 48, S.7-14.
20. **Kabelitz D.** (2012): Toll-like receptors: recognition receptors of the innate immune system and target structures for therapeutical intervention. *Med Monatsschr Pharm*, 35, S.238-244
21. **Kawai K.**, Shimura H., Minagawa M., Ito A., Tomiyama K., Ito M. (2002): Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Derm Sci*, 30, S.185-194
22. **Krishna S.**, Miller L.S. (2012): Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Semin Immunopathol*, 34, S.261–280
23. **Krueger J.G.**, Bowcock A.(2005): Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis*, 64, S.30-36.
24. **Lai Y.**, Gallo R.L. (2008): Toll-like receptors in skin infectious and inflammatory diseases. *Infect Disord Drug Targets*, 8, S.144–155.
25. **Lebre M.C.**, van der Aar A.M.G., van Baarsen L., van Capel T.M.M., Schuitemaker J.H.N., Kapsenberg M.L., de Jong E.C. (2007): Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*, 127, S.331-341
26. **Leung D.Y.M.** (2000): Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol*, 105, S.860-876.
27. **Leung D.Y.M.**, Boguniewicz M. (2011): Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunolo Rev*, 242, S.233-246.

-
28. **Matzinger P.** (2002): The Danger Model: a renewed sense of self. *Science*, 296, S.301-305
29. **Mempel M., Voelcker V., Köllisch G., Christian 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 κ B 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, S.1389-1396
30. **Miller L.S., Sørensen 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- α regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol*, 174, S.6137-6143
31. **Miller L.S.** (2008): Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol*, 24, S.71–87
32. **Mitsui H., Watanabe T., Saeki H., Mori K., Fujita H., Tada Y., Asahina A., Nakamura K., Tamaki K.** (2004): Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol*, 122, S.95-102
33. **Neis M.M., Peters B., Dreuw A, Wenzel J, Bieber T, Mauch C, Krieg T, Stanzel S, Heinrich PC, Merk HF, Bosio A, Baron JM, Hermanns HM.** (2006): Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 118,S.930-937
34. **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.M.** (2003): Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol*, 171, S.3262-3269

-
35. **Ong P.Y.**, Hamid Q.A., Travers J.B., Strickland I., Al Kerithy M., Boguniewicz M., Leung D.Y.M. (2002): Decreased IL-15 may contribute to elevated IgE and acute inflammation in atopic dermatitis. *J Immunol*, 168, S.505-510
36. **Olaru F.**, Jensen L.E. (2010): Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. *Exp Dermatol*, 19, S.314-316
37. **Owen M.J.**, Lamb J.R. 1991: Immunerkennung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
38. **Pivarcsi A.**, Bodai L., Rethi B., Kenderessy-Szabo A., Koreck A., Szell M., Beer Z., Bata-Csörge Z., Magocsi M., Rajnavölgyi E., Dobozy A., Kemeny L. (2003): Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol*, 15, S.721-730
39. **Reich K.**, Mössner R., König I.R., Westphal G., Ziegler A., Neumann C. (2002): Promoter polymorphisms of gene encoding tumor necrosis factor- α and Interleukin-1 β are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *J Invest Dermatol*, 118, S.155-163
40. **Sabat R.**, Sterry W., Philipp S., Wolk K. (2007) : Three decades of psoriasis research: where has it led us? *Clin Dermatol*, 25, S.504-509
41. **Sabat R.**, Wolk K. (2011): Research in practice: IL-22 and IL-20: significance for epithelial homeostasis and psoriasis pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 9, S. 518-523
42. **Shirakata Y.** (2010): Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *J Dermatol Sci*, 59, S.73-80.
43. **Schuler G.**, Steinmann R.M. (1985): Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med*, 161, S.526-546.
44. **Sterry W.** (2011): Kurzlehrbuch Dermatologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

-
45. **Tazawa T.**, Sugiura H., Sugiura Y., Uehara M. (2004): Relative importance of IL-4 and IL-13 in lesional skin of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.*, 295, S.459-464.
46. **Terhorst D.**, Naderi Kalali B., Ollert M., Ring J., Mempel M. (2010): The role of Toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases. *Am J Clin Dermatol*, 11, S. 1-10
47. **Tüzün Y.**, Antonov M., Dolar N., Wolf R. (2007): Keratinocyte cytokine and chemokine receptors. *Dermatol Clin*, 25, S.467-476
48. **Uchi H.**, Terao H., Koga T., Furue M. (2000): Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Derm Sci*, 24, S.29–38
49. **Wolfs T.G.A.M.**, Buurman W.A., van Schadewijk A., de Vries B., Daemen M.A.R.C., Hiemstra P.S., van't Veer C. (2002): In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN- γ and TNF- α mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*, 168, S.1286-1293
50. **Wolk K.**, Witte K., Sabat R. (2010): Interleukin-28 and Interleukin-29: novel regulators of skin biology. *J IFN- Cytokine Res*, 30, S.617-628

8 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit entsteht nicht nur durch eine einzelne Person, deswegen ist es an der Zeit, mich bei den Menschen zu bedanken, die mir die Fertigstellung meiner Dissertation ermöglicht haben. Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ehrhardt Proksch für die Vergabe des Themas an mich bedanken, für die Bereitstellung der nötigen Ressourcen und für die Hilfe bei der Korrektur der Dissertation.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Betreuer, Dr. med. Rüdiger Panzer, richten, der mich mit seinen Ratschlägen, seiner konstruktiven Kritik und seinem theoretischem sowie praktischen Fachwissen unterstützt hat. Ich bedanke mich für Dr. Panzers Geduld und Zeitaufwand mir das wissenschaftliche Arbeiten näher zu bringen.

Weiterhin möchte ich mich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen im gesamten wissenschaftlichen Bereich der Dermatologie bedanken, insbesondere bei Claudia Neumann, Nina Graumann, Elvira Jeske, Franziska Rademacher, Britta Hansmann, Nancy Speck und Maria Sperrhacke. Ohne Ihr Wissen, Ihre Ideen und Kritik wäre meine Forschungsarbeit nicht soweit gekommen. Außerdem bedanke ich mich bei meiner Laborpartnerin Ivana Topic für die gute Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung beim Experimentieren im Labor.

Ein großer Dank geht auch an meine langjährigen Freunde, die mir immer zur Seite standen.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nehmen meine großartige Familie und mein Partner ein, denen ich meine Dissertation widmen möchte. Danke, dass Ihr mich all' diese Jahre unterstützt habt. Ohne Euch wäre mein Medizinstudium und die Doktorarbeit niemals möglich geworden.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ljulkina
 Vorname: Alla
 Geburtsort: Arosavl, Russland
 Geburtsdatum: 10. November 1988
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Werdegang:

12/2014 Assistenzärztin in der Gynäkologie/Geburtshilfe
 Diakonissenkrankenhaus zu Flensburg

10/2014 2. medizinisches Staatsexamen nach ÄAppO 2002

seit 02/2011 Doktorandin an der Klinik für Dermatologie, Allergologie
 und Venerologie der Christian-Albrechts-Universität, Kiel

seit 10/2010 Immatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel

09/2010 Physikum (1. Staatsexamen nach ÄAppO 2002) in Bochum

10/2008-09/2010 Vorklinik an der Ruhr-Universität Bochum

2008 Abitur (Fördergymnasium)

1999-2008 Fördergymnasium, Flensburg

1996 Einschulung in die Grundschule „Osbeckschule“, Flensburg

1995 Einschulung in die Grundschule, Arosavl (Russland)