

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Technischen Universität München
Am Biederstein
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring

Expression von Toll-*like*-Rezeptoren auf B-Lymphozyten in
Abhängigkeit vom Immunglobulin-Klassenswitch.
Ein Vergleich von Atopikern und Nicht-Atopikern.

Bettina Angelika Seidl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. M. W. Mempel
2. Univ. - Prof. Dr. Dr. J. Ring

Die Dissertation wurde am 07. 02. 12 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18. 04. 12 angenommen.

Meinen Eltern, Brigitte Elisabeth und Hans-Peter, gewidmet. Danke.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung		5
1.1 Allergie und Atopie		5
1.2 Immundysfunktion bei Atopie und atopischem Ekzem		5
1.3 B-Lymphozyten als Zellen der Immunantwort		7
1.3.1 Entwicklung		7
1.3.2 B-Zell-Aktivierung: Die Keimzentrumsreaktion		10
1.4 Antigenrezeptor, Antikörper, Entstehung der Antikörpervielfalt		12
1.4.1 Klassenwechsel		13
1.5 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)		14
1.5.1 Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden		16
1.6 Toll-like-Rezeptor-Expression auf B-Zellen		22
2. Zielsetzung der Arbeit		26
3. Probanden, Material und Methoden		28
3.1 Probanden		28
3.1.1 Patienten mit Atopie		28
3.1.2 Kontrollpersonen		30
3.2 Material		31
3.2.1 Isolierung von peripheren Blut-mononukleären-Zellen (PBMCs)		31
3.2.2 Magnetisches Zellsortieren mit MACS und CD 19 <i>Microbeads</i>		32
3.2.3 Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren (FACS)		32
3.2.4 <i>Cell-Sorting</i> mit dem Zellsortiersystem des Zellsortierservice am Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München		33
3.2.5 RNA-Extraktion mit der Chloroform-Ethanol-Methode		33
3.2.6 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase		34
3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)		35
3.2.8 <i>In-vitro</i> Stimulation von B-Zellen		35
3.2.9 <i>Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay</i> (ELISA)		36
3.2.10 <i>IgE-Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Technique</i> (ELISPOT)		37
3.3 Methoden		38
3.3.1 Isolierung von peripheren Blut-mononukleären-Zellen mit Ficoll		38
3.3.2 Magnetisches Zellsortieren mittels MACS und CD19 <i>MicroBeads</i>		38
3.3.3 Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren (FACS)		40

3.3.4	<i>Cell-Sorting</i> mittels MoFlow®	42
3.3.5	RNA-Extraktion mit der Chloroform-Ethanol-Methode	44
3.3.6	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase, AMV	45
3.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
3.3.8	In-vitro Stimulation von B-Zellen	51
3.3.9	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay</i> (ELISA)	53
3.3.10	<i>IgE-Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Technique</i> (ELISPOT)	55
4.	Ergebnisse	56
4.1	Zellzahlen der naiven und <i>memory</i> B-Zell-Fraktion nach Zellseparation mittels MoFlow®	56
4.2	RNA-Mengen nach RNA-Extraktion bei sortierten naiven und <i>memory</i> B-Zellen	64
4.3	RT-PCR-Expression von TLR1-10 bei Patienten und Kontrollen bezüglich naiver und <i>memory</i> B-Zellen	65
4.4	Stimulationsansätze zum Ig-Klassenswitch zu IgE-proliferierenden B-Zellen mittels ELISA und ELISPOT Messung	73
5.	Diskussion	74
5.1	TLR-Expression auf B-Zellen	74
5.1.1	TLR-Expression auf B-Zellen - ein allgemeiner Überblick	76
5.1.2	TLR-Expression bei naiven versus <i>memory</i> B-Zellen	80
5.1.3	Vergleich Atopiker und Nicht-Atopiker	81
5.2	B-Zellen mit Klassenswitch zu IgE	83
5.3	Impfstoffadjuvantien - TLR-Liganden in der Therapie	85
6.	Literaturverzeichnis	89
7.	Zusammenfassung	98
8.	Abkürzungsverzeichnis	99
9.	Danksagung	102
10.	Lebenslauf	104

1. Einleitung

1.1 Allergie und Atopie

Allergische Erkrankungen sind von großer medizinischer und volkswirtschaftlicher Bedeutung. Betroffen sind Patienten jeden Alters und entsprechend dem klinischen Ausprägungsgrad ist die Lebensqualität unter Umständen extrem eingeschränkt. Der Begriff Allergie stammt aus dem Griechischen und bezeichnet die „andere Tätigkeit“ der Immunfunktion. In der Tat handelt es sich nach heutigem Verständnis um eine veränderte Immunitätslage mit genetischer Disposition. Daraus resultiert eine pathologische Überempfindlichkeit gegenüber nicht pathogenen Antigenen. (Ring, 2004). Viele Patienten leiden stark unter so unterschiedlichen Symptomen, wie Heuschnupfen, Ekzemen, Asthmaanfällen oder im schlimmsten Fall, lebensbedrohlichen Kreislaufreaktionen. Allergien begleiten die Betroffenen oft ein Leben lang und eine gute medikamentöse Behandlung sowie intensive Präventionsstrategien und Schulungen sind für ein optimales Krankheits*scoping* notwendig.

Nach Coombs und Gell werden die allergischen Reaktionen in 4 Typen (I bis IV) eingeteilt (Coombs und Gell, 1963).

1.2 Immundefunktion bei Atopie und atopischem Ekzem

Patienten mit atopischer Disposition weisen eine genetische Prädisposition auf, die durch Umweltfaktoren verstärkt werden kann. Hierzu zählen Allergene, Infektionen, physikalische Irritationen sowie psychische Belastungsfaktoren. Die atopische Disposition wird durch noch nicht vollständig aufgeklärte immunologische Besonderheiten charakterisiert. In der Mehrzahl der Patienten

finden sich ein erhöhter IgE-Spiegel und IgE-Immunkomplexe, zudem wird der hochaffine Rezeptor für IgE, Fcε RI, verstärkt auf Monozyten und Langerhanszellen dieser Patienten exprimiert. Patienten mit atopischer Disposition weisen eine TH₂-dominierte Immunantwort auf, die mit der Erhöhung von Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-13 (IL-13) einhergeht. Diese Zytokine werden von CD4⁺ (*Cluster of Differentiation*)-Lymphozyten produziert, die eine Differenzierung in Richtung einer TH-2 Immunantwort durchlaufen haben.

Grundsätzlich können sich Th₀-CD4⁺ Lymphozyten in den TH₁- oder TH₂- Typen differenzieren, welche sich hinsichtlich ihrer Funktion, ihres Chemokin-Rezeptor-Profiles und ihrer sezernierten Zytokine voneinander unterscheiden. Während TH₁-CD4⁺ Lymphozyten eine zelluläre Immunantwort vor allem durch die Sekretion von Interferon-γ (INF-γ) fördern, ist die TH₂- dominante Immunantwort von Atopikern durch IL-4, IL-5 und IL-13- Produktion bestimmt (Nakazawa et al., 1997, Parronchi et al., 1991, Wierenga et al., 1990, Van Reijsen et al., 1992).

Durch IL-4 und IL-13 wird eine Enzymaktivierung (Recombinase) im Zellkern der B-Zelle hervorgerufen, die zu einer bevorzugten Zusammenfügung der ε-Kette mit dem Junktionsstück (J) führt. Dadurch wird die Bildung von IgE-Antikörpern bewirkt (*Isotypen-Switch*) (Sallusto et al., 2000).

Neben den typischen durch IgE-Ausschüttung bedingten allergischen Symptomen können bei Atopikern auch unspezifische Veränderungen der Reaktivität der Haut und Schleimhaut auftreten.

1.3 B-Lymphozyten als Zellen der Immunantwort

1.3.1 Entwicklung (modifiziert nach Pezzutto et al., 2007)

B-Lymphozyten entstehen aus Stammzellen, die um die 14. Entwicklungswoche das Knochenmark (KNM) besiedeln und durch hohe lokale Konzentrationen des Chemokins CXCL12 chemotaktisch angezogen werden. Der Kontakt mit Stromazellen zusammen mit den Interleukinen IL-1, -6 und -7 sind essentiell für die effiziente B-Zell-Entwicklung. Das KNM bleibt ein Leben lang zentrale Produktionsstelle für B-Lymphozyten (Viau et al., 2005). Progenitor-B-Zellen (Pro-B-Zellen), als erste erkennbare Entwicklungsstufe der B-Zell-Reifung, zeigen typische Stammzell-assoziierte Antigene (CD34 und CD117). Zudem exprimieren sie die B-Linien-typischen Antigene CD19 und im Zytoplasma CD22. Der Pan-B-Zellmarker CD19 differenziert B-Zellen von anderen Zellen der lymphatischen und myeloischen Reihe und dient als wichtiger Marker, um B-Zellen mittels Sortieren zu separieren.

Zur Unterscheidung der wichtigsten B-Vorläufer-Zellen wurden von Burrows einige Oberflächenmarker beschrieben: CD10, CD19, CD20, CD24, CD34, CD38 und die Immunglobuline IgD und IgM (Burrows et al., 1995, 1997). Unterschiedliche Oberflächenmarker werden in verschiedenen Entwicklungsstadien exprimiert. Weiterhin wird bei Fluckinger et al. berichtet, dass B-Zellen im KNM CD38 exprimieren, reife B-Zellen jedoch kein CD38 auf ihrer Oberfläche aufweisen (Fluckiger et al., 1998). In fetalem Gewebe findet sich eine relativ große Verteilung von Pro-B-Zellen, Prä-B-Zellen und B-Zellen, was die Hypothese von multifokalem Ursprung der B-Zell-Linien unterstützt.

IgD und IgM sind weitere Merkmale, anhand derer die Identifikation unreifer und reifer B-Zellen möglich wird. Während sich unreife B-Zellen IgD-negativ zeigen, weisen reife B-Zellen IgD auf. Komplette IgM-Moleküle grenzen unreife

B-Zellen wiederum von ihren Vorläuferzellen ab. Reife B-Zellen und B-Gedächtniszellen rezirkulieren im Blut zwischen den lymphatischen Organen und dem KNM hin und her (Nunez et al., 1996). Mit zunehmendem Alter verringert sich dort die Anzahl an Vorläuferzellen und reife B-Zellen repräsentieren die stärkste Population, einhergehend mit Speicherung von Plasmazellen (Manz et al., 1997).

Die Ig-Synthese beginnt bereits im Stadium der Prä-B-Zelle. Diese besitzen im Zytoplasma schwere Ketten der IgM-Ig (μ -Ketten). Die unreife B-Zelle produziert als nächste Differenzierungsstufe ohne Kontakt mit Fremdartigen komplette IgM-Moleküle. Diese befinden sich auf der Zelloberfläche. Die weiteren Entwicklungsschritte sind nun antigengesteuert. Reagieren Igs unreifer B-Zellen mit körpereigenen Strukturen, leiten diese die Apoptose zum Schutz vor Autoreaktionen ein. Man geht davon aus, dass diese Autoantigene von KNM-Stromazellen im Sinne der klonalen Deletion bzw. klonalen Anergie gezeigt werden (Pezzutto et al., 2007). Liegt keine Autoreaktivität vor, kommt es zur Wanderung in T-Zell-reiche Zonen sekundärer lymphatischer Organe, welche durch die Chemokin-Rezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7 kontrolliert wird. Dort vollzieht sich eine erneute Selektion, da alle B-Zellen ohne adäquates T-Zell-Signal abermals in die Apoptose gehen. Nach diesem Prozess wandern sie in die Lymphfollikel und rezirkulieren als follikuläre B-Zellen zwischen dem KNM und den lymphatischen Organen, wo sie jederzeit in Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen (AP-Zellen) treten können. In diesem Stadium findet man auf der Oberfläche den typischen Marker IgD, die Differenzierungsantigene CD21, CD22, CD23 und CD37 und den Chemokin-Rezeptor CXCR5, welcher an CXCL13 bindet. Dieses wird in der B-Zell-Zone der sekundären lymphatischen Organe von follikulären dendritischen Zellen (FDC) und Stromazellen produziert (Pezzutto et al., 2007).

Wenn rezirkulierende B-Zellen nun auf Antigene in den Lymphknoten oder im Mukosa-assoziierten-lymphatischen Gewebe (MALT) treffen, differenzieren sie schließlich zu IgM-produzierenden Plasmazellen mit geringer Antigenaffinität. Um effektivere Antikörperreaktion zu gewährleisten, durchlaufen B-Zellen den Prozess der Antikörperreifung mit *Switch* und somatischer Hypermutation. Dies ermöglicht die Bildung der Antikörper-Klassen, IgG, IgA, IgE und die spezifische Feinjustierung im Bereich der variablen Regionen. Durch Einführen von Mutationen kann aus einer primär begrenzten Menge von Antikörpern eine scheinbar unbegrenzte Anzahl mit optimaler Affinität zum Pathogen erzeugt werden (Pezzutto et al., 2007).

Klein et al. konnten zeigen, dass der Teil der IgM- und IgD-positiven B-Zellen aus dem peripheren Blut, welcher zusätzlich CD27 auf der Oberfläche aufweist, mutierte variable Regionen besitzt, ganz im Gegensatz zu CD27- negativen B-Zellen. Somit besteht der B-Zell-Pool aus 40 % mutierten *memory* B-Zellen und 60 % nicht-mutierten, naiven CD27- negativen B-Zellen. Anhand dieser Ergebnisse bewährt CD27 sich im peripheren Blut als selektiver Zelloberflächenmarker für B-Gedächtniszellen des Menschen (Klein et al., 1998). IgM-B-Gedächtniszellen können im äußeren Mantelzonenbereich der Lymphknoten, im peripheren Blut, in der Marginalzone der Milz, in den Payerschen Plaques und aus den Tonsillen nachgewiesen werden (Liu, 1997, Tierens et al., 1999, Mansson et al., 2006). Dabei sezernieren sie Antikörper gegen bestimmte Mikroorganismen und sind durch ihre Lokalisation im Lymphsystem stets in Kontakt mit präsentierten Antigenen (Klein et al., 1998).

1.3.2 B-Zell-Aktivierung: Die Keimzentrumsreaktion (modifiziert nach Abbas, 2009)

Die Aktivierung von B-Lymphozyten resultiert aus der Proliferation von Antigen-spezifischen Zellen, welche im Lymphknoten mit FDCs in lockerem Kontakt stehen und führt zur klonalen Expansion der B-Zelle. Naive B-Zellen weisen wie erwähnt zwei Typen von membrangebundenen Antikörpern auf, IgD und IgM. Die Differenzierung zu Effektorzellen hat ihr Ziel in der Produktion von Antikörpern durch Plasmazellen, welche die gleiche Spezifität wie der B-Zell-Rezeptor (BCR) der naiven B-Zelle besitzen (Abbas et al., 2009). Wie effektiv dieses System arbeitet, wird an der Tatsache deutlich, dass nur eine aktivierte B-Zelle zur Bildung von bis zu 4000 Plasmazellen führt, welche im Stande sind, 10^{12} Antikörper pro Tag zu produzieren (Abbas et al., 2009). Nach Antigenkontakt wachsen folliculäre B-Zellen, welche in lymphatischen Organen lokalisiert sind, rasch. Diese Antigene werden durch den Blutstrom in die B-Zell-reichen Regionen der Follikel und Marginalzonen der peripheren lymphatischen Organe transportiert. Antigene werden von Makrophagen und FDCs, die sich im subkapsulären Sinus befinden, phagozytiert und in ihrer Funktion als AP-Zellen den naiven B-Zellen präsentiert. Mittels BCR wird das Antigen erkannt und es werden Signalwege in Gang gesetzt, welche die B-Zell-Aktivierung starten. Grundsätzlich ist eine Kreuzvernetzung (*Cross-linking*) notwendig, die durch Zusammenschlüsse von Antigenen oder wiederkehrenden Epitopen, wie z.B. bei Lipopolysacchariden (LPS) möglich ist. Rezeptor-assoziierte Proteine leiten die Signale in das Zellinnere weiter. Die zytoplasmatischen Domänen von Ig α und Ig β , welche den BCR bilden, enthalten Immunorezeptor-Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (ITAMs), welche in Folge des *Cross-linkings* phosphoryliert werden und so zu Anschlussstellen für weitere Adapterproteine werden. In B-Zellen sind diese Signalkaskaden noch nicht in dem Umfang, wie in T-

Lymphozyten verstanden, obwohl durchaus Parallelen auftreten. Letztendlich werden auf genetischer Ebene Transkriptionsfaktoren (*Myc*, *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), *Nuclear Factor* κ B (NF κ B) und Aktivierungsprotein 1 (AP-1)) hochreguliert, welche die B-Zell-Proliferation und Differenzierung steuern (Abbas et al., 2009).

Primäre B-Blasten weisen viel Zytoplasma auf und sind in der Lage, die umgebenen ruhenden, kleinen B-Zellen an den Rand des Follikels zu verdrängen. Dabei teilen sich die Blasten und es entstehen Zentrozyten, ohne, dass die absolute Zellzahl zunimmt, da die kleinen Zentrozyten mit gelapptem Zellkern unmittelbar aus der dunklen Zone des Follikels herauswandern und dabei die helle Zone bilden. Zahlreiche Makrophagen imponieren in dieser Grenzzone als sog. *tingible bodies* mit gelapptem Zellkern, da diese die apoptotischen Zentrozyten phagozytieren müssen. Am Ende der ca. dreimonatigen Keimzentrumsreaktion verbleiben nur noch wenige sekundäre Blasten im Zentrum eines „ausgebrannten“ Follikels (Pezzutto et al., 2007, Janeway et al., 1997). T-Zellen befinden sich im Lymphknoten im parafollikulären Kortex und migrieren in Richtung der B-Zell-Zone, so wie auch die aktivierten B-Zellen in Richtung der parafollikulären T-Zell-Zone wandern. Diese Migration wird maßgeblich durch die Expression von Chemokinen, wie dem CXCR5, CCR7, CXCL13 und dem CD57 gesteuert, welche von aktivierten Lymphozyten sezerniert werden. T-Helfer-Zellen erkennen nun die Peptidantigene, welche von B-Zellen mittels MHC-II-Rezeptoren präsentiert werden und initiieren die Umwandlung in sezernierende Plasmazellen durch Hilfe von CD40-Ligand (CD40L). Dieser bindet an CD40 von B-Zellen, um mit dessen Beteiligung die klonale Expansion und die Synthese und Sekretion von Antikörpern zu stimulieren.

Ebenso steuern T-Helfer-Zellen den Isotypen-Wechsel der schweren Ig-Ketten, so dass Antikörper aller Klassen (IgA, IgE und IgG) gebildet werden können. Tew

et al. postulierten, dass eine Subpopulation von B-Zellen aus dem Keimzentrum nach Immunstimulierung sofort die notwendigen Antigene und T-Zell-Signale erhält, um umgehend Antikörper zu produzieren (Tew et al., 1988). Hier liegt die Immunophysiologie der *Abwehr-Boosterung* durch Auffrisch-Impfungen begründet.

1.4 Antigenrezeptor, Antikörper, Entstehung der Antikörpervielfalt

Die Antikörper zählen, wie bereits erwähnt, zum humoralen Teil der Immunantwort. Die von B-Lymphozyten produzierten Glykoproteine können in membranständiger und sezernierbarer Form vorliegen. Membrangebunden fungieren die Igs auf B-Zellen als Antigenrezeptoren. Wenn sie von reifen B-Zellen ins Blut sezerniert werden, können sie dort Antigen-Antikörper-Komplexe bilden, welche phagozytiert werden oder in ihrer Funktion als Komplementaktivatoren für eine effizientere Abwehr sorgen (Pezzutto, 2007).

Antikörper sind jeweils aus zwei identischen leichten (L) und schweren (H) Ketten zusammengesetzt, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten existieren als kappa κ - und lambda λ - Ketten. Während der hypervariable N-terminale Bereich (NH_3^+) die Erkennung spezifischer Epitope bewirkt, womit Antigenbindung stattfinden kann, ist der konstante C-terminale Bereich (COO^-) hauptsächlich für die Aktivierung des Komplementsystems durch Bindung von Faktor C1q zuständig. Hierfür dient das Fc-Segment (*fragment cristallizable*). Bei der Spaltung von Igs mittels Papain entstehen drei Fragmente: zwei F(ab)-Fragmente mit Antigenbindungsfähigkeit und ein Fc-Fragment. Der Antikörpertyp wird durch die schweren H-Ketten bestimmt. Aufgrund struktureller Unterschiede werden fünf separate schwere Ketten (μ , γ , α , ϵ und δ) unterschieden, woraus sich, wie

folgt, die fünf Antikörperklassen ergeben: IgM, IgG, IgA, IgE und IgD mit sechs unterschiedlichen Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 und IgA2).

Die Antikörpervielfalt liegt in der Rekombination aus verschiedenen Genkassetten (V-, D- und J-Segmente), gefolgt von somatischer Hypermutation in den hypervariablen Regionen mit Austausch einzelner Aminosäuren begründet. So kann eine enorme Vielfalt an Antikörpern generiert werden, die jeweils mit optimaler Effektivität und Spezifität den Erreger binden können. Man spricht von Komplementaritäts-determinierenden Regionen (CDR), wobei bereits der Austausch einer singulären Aminosäure für die Stärke der Bindung eines bestimmten Antigens von Bedeutung ist. Diese 7 Aminosäuren befinden sich auf Position 30, 50 und 93 der leichten Ketten bzw. 32, 55 und 98 der schweren Ketten. Mit ihren drei antigenen Determinanten, der isotypischen, allotypischen und idiotypischen können Igs wiederum selbst als Antigene funktionieren (Pezzutto, 2007).

1.4.1 Klassenwechsel

Im Rahmen der Immunantwort werden verschiedene Ig-Klassen gebildet. Reifende B-Zellen produzieren zunächst IgM-/IgD-Ig wobei T-Helfer Zellen die B-Zellen dazu stimulieren, Antikörper unterschiedlich schwerer Ketten zu synthetisieren. Im Laufe des Reifungsprozesses werden die rearrangierten VDJ-Sequenzen direkt neben anderen C-Genen angeordnet. Jedes C-Gen wird von einer sog. S(*Switch*)-Sequenz gesteuert, die durch die unmittelbare Position vor der C-Sequenz den Umlagerungsprozess regulieren kann. Die zwischen den VDJ-Sequenzen und dem neuen C-Gen liegenden C μ -Sequenzen werden in diesem Schritt ausgeschnitten. Somatische Hypermutation und Klassenwechsel sind von der „*Activation-induced-cytidine-deaminase*“ (AID) abhängig. Dies konnte in einem Versuchsansatz von Muramatsu et al. gezeigt werden, indem

B-Lymphomzellen auch ohne Zytokinstimulation mit gezielter Überexpression von AID verstärkten *Switch* von IgM zu IgA aufwiesen (Muramatsu et al., 2000). Dieser Prozess erweitert die Möglichkeiten der humoralen Immunantwort, wodurch sowohl bakterielle als auch virale Erreger optimal eliminiert werden können. IgA stellt bereits in Körpersekreten die erste Abwehr für die natürlichen Eintrittspforten dar und IgE übernimmt in seiner ursprünglichen Rolle die Bekämpfung von Parasiten.

Bei CD40L handelt es sich um einen weiteren Faktor, durch welchen der *Klassenswitch* induziert werden kann und gerade in dieser Arbeit wegen des gewünschten *Switch* zu IgE von zentralem Interesse war. Fehlt CD40 oder CD40L kann lediglich IgM produziert werden, der *Switch* unterbleibt jedoch. *X-linked* Hyper-IgM Syndrom ist das Beispiel einer Krankheit, welche aus einer Fehlfunktion dieser CD40-CD40L Interaktion resultiert (Revy et al., 2000).

1.5 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Seitdem im Jahre 1997 der Toll-ähnliche Rezeptor bei Menschen gefunden wurde, sind weitere 13 TLRs bei Säugetieren entdeckt worden (Anderson, 2000, Takeda et al., 2003). Jedoch existieren nicht all diese TLRs beim Menschen. Toll-Rezeptoren wurden unter anderem von der Nobelpreisträgerin Christine Nüsslein Volhard bei Forschungen an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Anderson et al., 1985, Nüsslein-Volhard et al., 1991, Hashimoto et al., 1988). TLRs bestehen aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne und einem zytoplasmatischen Bereich, wobei man TLRs auf Grund der Ähnlichkeit zum IL-1-Rezeptor zu dieser Familie zählt (Fitzgerald et al., 2000).

Pathogen-Associated-Molecular-Patterns (PAMPs) stellen die wichtigsten Liganden der TLRs dar. Sie werden als konservierte Strukturen von den Liganden-Bindungsdomänen erkannt und sind im Wirtsorganismus nicht zu

finden. Die Spezifität dieser Erkennung erfolgt mittels Leucin-reicher Wiederholungen (LRR).

Der wichtigste Ligand wurde von dem Forscher Bruce Beutler am Scripps Research Institute (La Jolla, San Diego, Kalifornien, USA) identifiziert (Poltorak et al., 1998). Es wurde deutlich, dass es sich bei dem Lipopolysaccharid (LPS), dem Zellwandbestandteil und Endotoxin gram-negativer Bakterien (Qureshi et al., 1999), um den Liganden für TLR4 handelt. Somit wurde der bis dahin unbekannte Rezeptor für LPS identifiziert. Es gibt viele Untersuchungen, welche die Hochregulation dieses TLRs bei Inflammationsreaktionen zeigen (Hausmann et al., 2002). Die Erforschung dieses Signalweges ist von unmittelbarer klinischer Bedeutung, wenn man die teils fatalen Auswirkungen von Infektionen mit gram-negativen Erregern und mögliche Komplikation mit schwerer Sepsis bedenkt. Diese Entdeckung wurde mit der Vergabe des Nobelpreises im Jahr 2011 geehrt.

Zentrales intrazelluläres Adaptermolekül für fast alle TLRs ist der *myeloid differentiation factor 88* (MyD88). Er bindet an den zytoplasmatischen Abschnitt der TLRs, woran die IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase (IRAK) andockt und sich durch Autophosphorylierung selbst aktivieren kann. Anschließend wird das Signal in den Zellkern weitergeleitet, wo die Translokation des Transkriptionsfaktors *Nuclear* Faktor κ B (NF κ B) stattfinden kann. Durch diesen Schritt wird die Expression von Genen für z.B. TNF α , IL-1, IL-12 und E-Selektin gesteuert, die alle im Rahmen von inflammatorischen Prozessen vermehrt nachgewiesen werden können.

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 können auf Grund ihrer Lage auf der äußeren Zellmembran mit extrazellulären Erregern und Toxinen interagieren. Die vier intrazellulären TLRs, TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 befinden sich in Endosomen und im endoplasmatischen Retikulum, wobei die ligandenbindende Domäne zum Lumen hin ausgerichtet ist (Heil et al., 2003, Matsumoto et al., 2003). Nach

Aufnahme von intrazellulären Erregern in das Endosom können letztgenannte TLRs ihre Liganden erkennen.

1.5.1 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

In dem Paper: „*Toll-like receptors: critical protein linkin innate and acquired immunity*“ aus Nature Immunology Reviews beschreiben Akira, Takeda und Kaisho eine systematische Auflistung der TLR1-9 mit ihren jeweiligen Liganden. TLR1, -2 -3 und -6 sind auf Chromosom 4 lokalisiert, TLR4 auf Chromosom 9, TLR5 auf Chromosom 1 und TLR7-9 auf Chromosom 3 (Akira et al., 2001, Kaisho et al., 2002).

TLR2

Dieser Rezeptor interagiert mit TLR1 oder TLR6, für welche sich die kodierenden Gene auf dem gleichen Chromosom befinden und die sich das Prinzip der Rezeptorheterodimerisierung zu Nutze machen.

TLR1 findet sich auf der Oberfläche von Makrophagen und Neutrophilen. Durch die Wechselbeziehung der genannten Rezeptoren untereinander können Triacyl- bzw. Diacyllipoproteine erkannt werden und das natürliche PAMP-Ligandenspektrum von Mycoplasmen, Viren und Zellwandkomponenten, wie Peptidoglykanen, Lipoproteinen, Lipoarabinomannan und Zymosan erweitert werden (Hoshino et al., 1999, Takeuchi et al., 1999).

Schröder et al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass bei bis zu 10% der TLRs sog. *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in der weißen Bevölkerung auftreten, welche mit infektiösen Erkrankungen korrelieren, jedoch andererseits vor Arteriosklerose zu schützen scheinen.

Besonders SNPs in der Sequenz für TLR2 sollen in Zusammenhang mit einer erhöhten Suszeptibilität für infektiöse und inflammatorische Erkrankungen stehen (Schröder et al., 2005).

TLR10

Dieser Rezeptor wird nur in humanen Zellen exprimiert, in der Maus trägt die korrespondierende Gensequenz ein Stop-Kodon. Er ähnelt in seiner Primärstruktur dem TLR1 und TLR6, sein Ligand ist bis jetzt noch unbekannt (Chuang et al., 2001, Kawai et al., 2010).

TLR4

Dieser Rezeptor steht im Zentrum des immunologischen Interesses und sein Hauptligand ist das LPS, der Hauptbestandteil in der Zellmembran gram-negativer Bakterien (Qureshi et al., 1999). Dieses ist für den lebensbedrohlichen Endotoxin-Schock verantwortlich (Ulevitch et al., 1995). Mutationen in diesem Rezeptor stehen auch in Zusammenhang mit verminderter Ansprechbarkeit auf Endotoxine beim Menschen (Arbour et al., 2000). Es existieren noch weitere Liganden, wie das Fibrinogen, Surfactant Protein-A und Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang jedoch eine mögliche Kontamination mit ubiquitär auftretendem LPS (Tsan et al., 2007), das als physiologischer Ligand bereits identifiziert wurde. Für die Erkennung von LPS ist zusätzlich das LPS bindende Protein (LBP) notwendig. Durch Interaktion von LBP, CD14 und *myeloid differentiation factor 2* (MD-2) bilden sich Komplexe. Diese Modifikation mit MD-2 und CD14, welche beide keine intrazytoplasmatischen Domänen aufweisen, ist notwendig, um die Spezifität der LPS-Erkennung zu optimieren (Medzhitov, 2001).

TLR5

TLR5 erkennt bakterielles Flagellin von gram-negativen und gram-positiven Bakterien (Hayashi et al., 2001), welches die Fortbewegung von Mikroorganismen ermöglicht, aber auch einen potenten inflammatorischen Faktor darstellt. Flagellin induziert eine NFκB-Aktivierung und Nitritoxid-Synthetase-Expression (Eaves-Pyles et al., 2001). Untersuchungen zeigten, dass Flagellin von *Listeria monocytogenes* bei nicht Flagellin-exprimierenden *Escherichia coli* die Fähigkeit TLR5 zu aktivieren stimulieren kann, wohingegen die Ausschaltung von Flagellin Genen bei *Salmonella typhimurium* die TLR5-Stimulationsaktivität herunter regulierte (Akira et al., 2001). Die TLR5-Aktivierung bewirkt neben IgG-Induktion auch die Ausdifferenzierung von B-Zellen in IgA-produzierende Plasmazellen (Skountzou et al., 2010).

TLR11 existiert nur bei der Maus und zeigt große Ähnlichkeit zu TLR5.

TLR3, TLR7, TLR8, TLR9

Diese Rezeptoren sind in der Lage, Nukleinsäuren von Bakterien und Viren zu erkennen (Heil et al., 2004, Hemmi et al., 2000, Kariko et al., 2004). Daher befinden sich diese auch intrazellulär, können dort virale Erreger erkennen und eine antivirale Immunantwort hervorrufen (Heil et al., 2003, 2004, Diebold et al., 2004). TLR3 befindet sich im Endolysosom und ist der Rezeptor für virale doppelsträngige RNA, TLR7 und TLR8 erkennen virale einzelsträngige RNA (Hemmi et al., 2002). Werden diese TLRs aktiviert, resultiert daraus die Bildung von Interferon I, die Aktivierung von NFκB und die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen (Alexopoulou et al., 2001). TLR3 ist darüber hinaus noch an der Erkennung von Poly I:C, einem Äquivalent von dsRNA, beteiligt.

TLR9 spielt in der Erkennung bakterieller DNA eine große Rolle. Im Gegensatz zu methylierter DNA, die in eukaryonten Zellen dominiert, kann bakterielle

DNA (die vorwiegend unmethyliert vorliegt) oder ihr Äquivalent, CpG-ODNs (Unmethylierte Nukleotidstränge mit Cytosin-Guanin-Motiven), nach Erkennung durch TLR9 murine und humane Lymphozyten stimulieren (Hemmi et al., 2000).

Um die wirtseigene DNA von fremder DNA zu differenzieren, macht sich der TLR9 die Unterschiede in der zufälligen Häufigkeitsverteilung einzelner DNA-Basen zunutze (Muzio, Mantonai, 2000). Die Wahrscheinlichkeit, dass Cytosin und Guanin nacheinander auftreten, beträgt bei bakterieller DNA 1:16, anders als bei Säuger-DNA, wo eine Häufigkeit von 1:64 vorliegt. Zudem stellt sich die Wirts-DNA in 80 % an der C-Position am 5'-Ende methyliert dar (Krieg et al., 2007). Mithilfe dieser Strukturmerkmale kann TLR9 zwischen fremder DNA von Bakterien und Viren und „eigener“ DNA unterscheiden.

Da eine gezielte Aktivierung von TLR9 für viele Gebiete von großem Interesse ist, konzentrierte sich die Forschung schon sehr bald darauf, synthetische Aktivatoren von TLR9 zu konstruieren, sog. Oligodinukleotide (ODN), welche mit einer Phosphorothionat-Gruppe modifiziert, von intrazellulärem Abbau durch Nukleasen geschützt sind. Diese CpG-ODNs können Zelltypen aktivieren und die Immunantwort in definierte Richtungen lenken (Wagner et al., 2002).

Deshalb ist auch gerade dieser TLR bei der Erforschung von B-Lymphozyten von Bedeutung. CpG-DNA stimuliert direkt B-Zellen, Makrophagen und DCs, woraufhin Zytokine, insbesondere die TH₁-assoziierten IL-12 und IL-18 sezerniert werden. Dementsprechend bieten CpG-Motive einen möglichen Ansatzpunkt, als Adjuvantien bei Impfungen oder Hyposensibilisierungsbehandlungen wirksam zu sein (Tighe et al., 2000).

Ein Beispiel für einen bereits klinisch eingesetzten Therapieansatz liefert der Einsatz von Aldara® (Imiquimod), einem TLR7-Liganden. Die durch Aldara®

induzierte inflammatorische Immunreaktion bekämpft aktinische Keratosen, die als Vorstufen von spinozellulären Karzinomen und Basalzellkarzinomen gelten (Heil et al., 2003, Amelie-Lefond et al., 2005).

Tab. Zusammenschau über TLRs, Liganden und Zelltypen

TLR	Ligand	Lokalisation	Adaptormolekül	Lokalisation	dominant exprimierender Zelltyp
TLR1	Triacyl Lipopeptide	Bakterien	MyD88/MAL	extra zellulär	Monozyten/Makrophagen/ DCs/B-Zellen
TLR2	Glykolipide/Lipopeptide/ Lipoproteine/LTA/ HSP70 Zymosan	Bakterien Wirtszelle Pilze	MyD88/MAL	extra zellulär	Monozyten/Makrophagen/ Mastzellen/myeloide DCs
TLR3	dsRNA/Poly I:C	Viren	TRIF	intra zellulär	DCs/B-Zellen
TLR4	LPS HSP/Heparansulfat/ Hyaluronsäure/Nickel	Bakterien und Wirtszellen	MyD88/MAL/ TRIF/TRAM	extra zellulär	Monozyten/Makrophagen/ Mastzellen/myeloide DCs/ intestinale Epithelien
TLR5	Flagellin	Bakterien	MyD88	extra zellulär	Monozyten/Makrophagen/DCs/ intestinale Epithelien
TLR6	multiple Diacyl Lipopeptide	Mykoplasmen	MAL	extra zellulär	Monozyten/Makrophagen/ Mastzellen/B-Zellen
TLR7	Imidazoquinoline/ Loxoribine (Guanosin- Analogon)/ Bropirimine/ssRNA	kleine synthetische Komponenten	MyD88	intra zellulär	Monozyten/Mastzellen/ plasmazytoide DCs/B-Zellen
TLR8	kleine synthetische Komponenten/ssRNA		MyD88	intra zellulär	Monozyten/Makrophagen/DCs/ Mastzellen
TLR9	CpG-ODN	Bakterien	MyD88	intra zellulär	Monozyten/Makrophagen/ plasmazytoide DCs/B-Zellen
TLR10	unbekannt	nicht bekannt	Nicht bekannt	extra	Monozyten/Makrophagen/

				zellulär	B-Zellen
TLR11 Maus	Profilin	Toxoplasma gondii	MyD88	intra zellulär	Monozyten/Makrophagen/Leber/ Milz/Blasenepithel
TLR12 Maus	unbekannt		Nicht bekannt	Nicht bekannt	Neurone
TLR13 Maus	unbekannt	Viren	MyD88	Intra Zellulär	

MyD88 (Myeloider Differenzierungsfaktor 88)

MAL (MyD-Adapter like)

TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β)

TRAM (TRIF-related adapter molecule)

Neben den Liganden aus obenstehender Tabelle können auch Liganden endogenen Ursprungs die TLR-Signalkaskade in Gang setzen, indem diese z. B. bei oxidativem Stress ausgeschüttet werden („*Damage-Associated Molecular Patterns*“). Zu TLR2- und TLR4- Aktivierung führen *Reactive Oxygen Species* (ROS) und *High Mobility Group Box 1*- Proteine (HMGB1), wie in der Studie von Park et al. beschrieben wurde (Park et al., 2006), β -Defensin 2 und 3 sind in der Lage TLR2 und TLR4 auf DCs zu stimulieren (Biragyn et al., 2002), *Surfactant-A* aus der Lunge induziert die TLR4-Stimulation (Guillot et al., 2002), ebenso wie Fibronektin (Okamura et al., 2001, Su et al., 2005), Hyaluronsäure bei DCs (Termeer et al., 2002), Fibrinogen bei Makrophagen (TLR4) (Smiley et al., 2001) und HSP60 und -70 bei B-Zellen (Cohen-Sfady et al., 2005, Sato et al., 2000).

TLR3, -7, -8 und -9 sind in der Lage, neben bakteriellen und viralen auch wirtseigene Nukleinsäuren zu erkennen (Heil et al., 2004, Hemmi et al., 2000, Kariko et al., 2004).

Zellen mit diesen Rezeptoren können mit Hilfe von Imidazoquinolinen (z.B. Imiquimod, R-848 = Resiquimod) aktiviert werden (Heil et al., 2003). Hierbei handelt es sich um synthetisch hergestellte Stoffe, die antivirale und

antitumoröse Eigenschaften aufweisen. Mittels Imiquimod (Aldara®) ist die Therapie von Basalzellkarzinomen, aktinischen Keratosen und Papillomavirus-Warzen möglich (Stockfleth et al., 2002, Amlie-Lefond et al., 2005, Jurk et al., 2002). Viele Immunzellen können die TLR-Expression je nach Zytokinaktivierung unterschiedlich regulieren, z. B. TLR2 als Ko-Stimulans in T-Zellen (Komai-Koma et al., 2004, Gelman et al., 2004), TLR9 und TLR10 bei B-Zellen (Bourke et al., 2003) und TLR1-10 in PBMCs (Hornung et al., 2002), bei Monozyten und DCs (Visintin et al., 2001). Je nach Aktivierung werden unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden getriggert, die jeweils zu einer Vielzahl von zellulären Antworten führen (Akira et al., 2001) mit nachfolgender Zytokinproduktion und inflammatorischer Antwort (Iwasaki et al., 2004, Akira et al., 2001 und 2003).

1.6 TLR-Expression auf B-Zellen

TLRs gehören zur Familie der Transmembranrezeptoren und spielen eine besondere Rolle im angeborenen Immunsystem. B-Zellen synthetisieren im Rahmen der Differenzierung die Igs einschließlich IgE und nehmen daher eine zentrale Stellung bei allergischen Erkrankungen ein.

Die Erforschung dieser Immunzellen ist sehr interessant, um die möglichen Zusammenhänge zwischen TLRs und B-Zellen zu verstehen. Die TLR-Expression wird in naiven B-Zellen durch BCR-Stimulation bei der Proliferation, beim Isotypen-*Switch* und bei der Differenzierung hochreguliert (Ruprecht et al., 2006). TLR-Stimulation wiederum ist ein entscheidender Schritt zur Plasmazelldifferenzierung.

Derzeit besteht die Vorstellung, dass das erste Signal, die BCR-Stimulation und das zweite Signal, die T-Zell-Hilfe, gemeinsam zeitlich interagieren müssen, um die Proliferation von der naiven B-Zelle zur Ig-sezernierenden Plasmazelle zu

ermöglichen. Jedoch ist für diese Entwicklung und die Proliferation nach mehreren Zellteilungen noch ein drittes Signal, zum Beispiel in Form von TLR-Agonisten durch eine Vielzahl von mikrobiellen Produkten notwendig, die entweder direkt auf die von der B-Zelle gebildeten TLRs wirken können oder indirekt durch Aktivierung von DCs und Zytokinausschüttung (IL-6 und IL-12) ihre Funktion erfüllen (He et al., 2004, Xu et al., 2008).

Über den Zusammenhang zwischen IgE-*Switch* und TLR-Expression ist in der einschlägigen Literatur bisher wenig beschrieben. Umso interessanter ist deswegen eine Untersuchung des TLR-Repertoires auf naiven und *memory* B-Zellen von Patienten mit Risiko für IgE-vermittelte Erkrankungen. Hierbei ist die Frage des Isolierungsortes relevant, während einige Autoren die Isolation und Analyse von B-Zellen aus Tonsillengewebe beschreiben (Mansson et al., 2006), gibt es nur wenig Literatur über TLRs auf B-Zellen des peripheren Blutes.

In der Vergangenheit wurde die Expression von TLR1, -2, und -9 mittels PCR beschrieben. TLR1 zur Erkennung von Lipoproteinen konnte zusätzlich mittels Antikörperbindung auf 15-90 % der ruhenden B-Zellen festgestellt werden (Dasari et al., 2005). Es gibt starke Hinweise darauf, dass TLR9 eine große Rolle in der B-Zell-Physiologie spielt. Dieser Rezeptor gehört, wie bereits beschrieben, zum angeborenen Immunsystem (Bernasconi et al., 2003, Hemmi et al., 2000, Bauer et al., 2001, Krug et al., 2001). Bourke et al. zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen TLR9-Stimulation und Ig-Synthese, was diesen Rezeptor zu einem potentiellen Zielpunkt für therapeutische Interaktionen macht (Bourke et al., 2003).

Bei der Untersuchung von B-Zell-vermittelten Auto-Immunprozessen konnte gezeigt werden, dass Proteinpartikel und Nukleinsäuren durch synergistische Effekte von BCR und TLR9-Autoantikörper-Formationen induzieren können (Viglianti et al., 2003, Rui et al., 2003, Leadbetter et al., 2002), wobei jedoch

noch offen bleibt, ob die BCR-TLR-Interaktion eine notwendige Voraussetzung auch in Anwesenheit von T-Helfer-Zellen darstellt.

TLR3, TLR4 und TLR5 konnten in bisherigen Studien nicht konstant auf B-Zellen nachgewiesen werden, was speziell bei Abwesenheit von TLR4 zu verminderter bis nicht vorhandener Stimulierbarkeit mit LPS führt (Mannson et al., 2006). Bezüglich TLR1 und TLR6-10 zeigen die Studien ähnliche Tendenzen (Peng et al., 2005).

In einer Studie über *memory* B-Zellen beschrieben Bourke und Bernasconi in ihrer Arbeit, dass humane B-Zellen im Gegensatz zu Maus-B-Zellen als *memory* B-Zellen vor allem TLR2, -6, -7, -9 und -10 exprimieren (Bourke et al., 2003, Bernasconi et al., 2003), wodurch konsequenterweise TLR-Agonisten in der Lage sind, *memory* B-Zellen im Gegensatz zu naiven B-Zellen zu aktivieren. Die Expression von TLR7, -9 und -10 wurde drastisch hochreguliert bei B-Zellaktivierung *in vivo*, wohingegen die Expression anderer TLRs unverändert blieb. Die Expression von TLR-Komplexen kann somit durch ein immunologisches oder mikrobielles Agens reguliert werden.

Um die Triggermechanismen für naive B-Zellen zu identifizieren und die beiden B-Zell-Gruppen der naiven und *memory* B-Zellen zu untersuchen, ist es notwendig, diese zwei Populationen zu isolieren. In vorangegangenen Studien wurden Isolationen bereits bezüglich der Expression von IgD (Nicholson et al., 1995, Klein et al., 1993) und CD27 (Tangye et al., 1998, Klein et al., 1998) durchgeführt. Auch ist bei Ruprecht et al. die naive B-Zell-Isolationmethode mittels dem Marker „ABCB1 Transporter“ beschrieben, die jedoch in der vorliegenden Arbeit keine Anwendung fand (Ruprecht et al., 2006).

Bezüglich einer möglichen Besonderheit im TLR-Repertoire von Atopikern ist in der gängigen Literatur nichts beschrieben, obwohl eine genetisch veränderte Prädisposition in der Immunitätslage Unterschiede zu gesunden Probanden

wahrscheinlich macht. Etliche Studien fokussierten sich auf die Differenzen zu Malignomzellen und viral infizierten Zellen (Balkwill et al., 2001, Mantovani et al., 2002, Mazzuchelli et al., 1999). Hierbei wurden auf Grund der malignen Entartung deutlich erhöhte TLR-Stimulierbarkeit und erhöhte TLR9- und TLR10-Mengen beschrieben. Diese Ergebnisse korrelierten mit vermehrter Wachstumsneigung und unkontrolliertem Differenzierungsprozess bei Tumorzellen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von B-Lymphozyten und deren TLRs in einem Vergleich von Atopikern und Nicht-Atopikern bezüglich der jeweiligen Expression der Rezeptoren im Laufe der B-Zell-Differenzierung einhergehend mit dem Ig-Klassen-*Switch*.

Ein genaues Verständnis über das Repertoire, die Funktionsweisen und Ausprägungen dieser Rezeptoren auf B-Zellen von Atopikern ermöglichen es uns eventuell in Zukunft, diese Erkrankungen besser zu verstehen, therapieren oder gar verhindern zu können.

2. Zielsetzung der Arbeit

Wie aus der Einleitung hervorgeht, gehören TLRs zur Familie der Transmembranrezeptoren und spielen eine besondere Rolle im angeborenen Immunsystem. Die bisher publizierten Studien liefern zahlreiche Informationen über ihre Rolle bei Neutrophilen, Monozyten und DCs, da diese das größte Repertoire an TLRs aufweisen, aber es gibt nur wenig Ergebnisse über die Expression von TLRs auf Lymphozyten. Speziell B-Lymphozyten nehmen auf Grund von spezifischer Antikörperproduktion in der Verbindung von angeborenem und erworbenem Immunsystem eine Schlüsselrolle ein. Die regulierte Expression von bestimmten TLRs auf B-Lymphozyten beeinflusst zahlreiche Funktionen des Immunsystems, sowohl unter normalen, als auch unter pathologischen Bedingungen (vgl. Auto-Antikörperproduktion bei Lupus erythematodes).

TLRs auf B-Zellen sind an der Regulation des Klassen-*Switch* beteiligt und bei der Bildung von Auto-Antikörpern (v.a. IgG) von entscheidender Bedeutung. Speziell über den IgE-*Switch* und dessen Zusammenhang mit TLRs auf B-Zellen ist bisher wenig bekannt. Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war die Expression von TLRs auf B-Zellen zu ermitteln und mögliche Unterschiede in den Subpopulationen von *memory* und naiven B-Zellen zu identifizieren. Zudem sollte speziell das TLR-Repertoire auf IgE-produzierenden B-Zellen bestimmt werden, um die einzelnen Populationen funktionell zu charakterisieren und Veränderungen der TLR-Expression durch den Klassenwechsel zu identifizieren. Hierfür sollten die isolierten B-Zellen in ihre Subpopulationen bezüglich der Ig-Produktion aufgeteilt werden und die jeweilige TLR-Expression im Zusammenhang mit dem Klassenswitch von IgM/IgD-produzierenden B-Zellen zu IgE-produzierenden Plasmazellen dargestellt werden. Möglicherweise ergibt sich durch ein unterschiedliches Ausprägungsmuster der TLRs bei Atopikern im

Vergleich zu gesunden Probanden ein potentieller Ansatzpunkt, um die Pathogenese und das Entstehen dieser Krankheit zu verstehen, die Einflüsse bei der Entwicklung, Reifung und Aktivierung der B-Zelle zu untersuchen und eine Ursache, die eventuell im veränderten Klassen-*Switch* durch unterschiedliche TLR-Expression begründet liegt, zu finden.

3. Probanden, Material und Methoden

3.1 Probanden

3.1.1 Patienten mit Atopie

Die Patientengruppe dieser Dissertation entstammte der Atopiesprechstunde der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München, Am Biederstein. Die Rekrutierung erfolgte bezüglich der Erkrankung eines atopischen Ekzems mit einhergehenden hohen Gesamt-Serum IgE-Spiegeln. Bei allen Analysen lag der Wert deutlich über 1000 IU/ml.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei Erkrankungen mit atopischer Genese oftmals nicht um singuläre Pathologien, weshalb auch andere Symptome aus diesem Formenkreis teils bei den Patienten auftraten, wie Rhinokonjunktivitis allergica, allergisches Asthma bronchiale oder klinisch relevante Nahrungsmittelallergien. Keiner der Patienten wurde systemisch immunsuppressiv therapiert, weder mit Cyclosporin, noch mit Kortikoiden.

Tab. 3.1 Übersicht über die Patienten

Proband	Geschlecht, Alter	Gesamt IgE (IU/ml)
1, SU	W, 40	2477
2, OR	M, 55	2703
3, KE	M, 31	1822
4, TH	W, 82	38 159
5, PD	M, 33	11 393
6, RN	M, 48	19 959
7, EH	M, 38	6727
8, TB	M, 33	9874

9, RC	W, 32	1713
10, KS	W, 61	9587

Tab. 3.2 Spezifische Sensibilisierungen;

D.t.=Derm. pteronyssinus; Ka=Katzenepithel; Hü=Hühnereiweiß; Er=Erdnuss;
 So=Sojabohne; Ha=Haselnuss; Mi=Milcheiweiß; Pa=Paprika; Kr=Krabbe;
 To=Tomate; Sc=Schweinefleisch; Ri=Rindfleisch; Cu=Curry; Do=Dorsch;
 KR=Karotte; We=Weizenmehl; Ap=Apfel; Ro=Roggenmehl; Se=Sellerie;
 Li=Lieschgras; La=Latex; Wa=Warzenbirke; Be=Beifuß;

- 0= < 0,1 kU/ml negativ
 1= 0,35 - 0,69 kU/ml sehr schwach positiv
 2= 0,70 - 3,49 kU/ml schwach positiv
 3= 3,50 - 17,49 kU/ml positiv
 4= 17,50 - 52,49 kU/ml stark positiv
 5= 52,50 - 99,99 kU/ml sehr stark positiv
 6= > 100,0 kU/ml sehr stark positiv

	D.t	Ka	Hü	Er	So	Ha	Mi	Pa	Kr	To	Sc	Ri	Cu	Do	KR	we	Ap	Ro	Se	Li	La	wa	Be
1, SU	6	6	2	2	3	2	0	0	0	1	3	1		6	1	2	0	1	2	6	2	6	2
2, OR	6	6	0				1							0		2			2	6	2	1	0
3, KE	6	4	0				2							0		1			0	5	0	3	1
4, TH																					2		
5, PD	6	6	1													2			2	6	1	6	4
6, RN	6	6	1	3	2	5	1	3	0	3	1	0	2	1	3	4	5	3	3	6	3	6	4
7, EH	3	4	0				0							0		2			2	6	2	2	3

8, TB	2	1	1	2	2	2			1	2	1	1			2	2	2	2	1	3	1	2	3
9, RC	6	6	1				0							0		2			1	6	0	5	1
10, KS	6	6	6				2							2		4			3	6	2	3	2

3.1.2 Kontrollpersonen

Bei der Gruppe der Kontrollpersonen handelte es sich bezüglich allergischer Erkrankungen um gesunde Probanden. Diese wurden zufällig aus einem gemischten Kollektiv rekrutiert und zeichneten sich durch Abwesenheit von Überempfindlichkeitsreaktionen jeglicher Art aus. Auch war anamnestisch in der Vergangenheit keinerlei allergische bzw. atopische Neigung zu eruieren.

Tab. 3.3 Zusammenschau der gesunden Kontrollpersonen

Kontrollperson	Geschlecht, Alter
12, BS	W, 53
13, BAS	W, 24
14, CS	M, 22
15, MS	M, 20
16, LB	M, 26
17, SZ	M, 25
18, SS	W, 24
19, CMS	W, 22
20, PS	M, 61

3.2 Material (bestehenden etablierten Laborprotokollen entnommen)

3.2.1 Isolierung von peripheren Blut-mononukleären-Zellen, *peripheral-blood-mononuclear-cells* (PBMCs)

Tab. 3.4 Reagenzien

peripher abgenommenes venöses Spenderblut, 10 ml EDTA (Ethylendiamin-Tetraacetat) Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
Ficoll <i>separating solution</i> 1,077 g/ml	Biochrom AG, Berlin, D
PBS (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, D

Tab. 3.5 Geräte

Werkbank, steril	HERA-safe, ThermoScientific, Dreieich, D
Falcon 50 mL	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	Megafuge Heraeus, ThermoScientific, Dreieich, D
Absaugpumpe	Laborbedarf Saur, Reutlingen, D
Neubauerzählkammer, Tiefe 0,100mm; 0,0025 mm ²	Karl Hecht GmbH, Sondheim, D

3.2.2 Magnetisches Zellsortieren mit MACS und CD19 *Microbeads*

Tab. 3.6 Reagenzien

MACS Puffer (PBS, 0,5 % BSA, EDTA 2 mM)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
BSA (Bovines Serumalbumin) Fract. V > 96 % pulv.	Roth, Karlsruhe, D
EDTA 0,5 mM, pH 8,0	Invitrogen, Karlsruhe, D
CD19 MicroBeads, <i>conjugated to monoclonal antihuman CD19 antibodies (isotype: mouse IgG1); Suspension containing stabilizer und 0,05 % sodium azide</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

Tab. 3.7 Geräte

Auto MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
-----------	---------------------------------------

3.2.3 Fluoreszenz-aktivierte-Zell-Separation, *Fluorescence-activated-Cell-Sorting (FACS)*

Tab. 3.8 Reagenzien

Fluoreszenzantikörper

CD27-APC Antikörper IgD-FITC Antikörper CD19-PE Antikörper	BD Pharmingen, Heidelberg, D
--	------------------------------

Tab. 3.9 Geräte

FACS Gerät, FACSCalibur	Becton Dickinson, New Jersey, USA/Heidelberg, D
FACS Platten 96 <i>well</i>	Peske GmbH&Co. Aindlingen- Arnhofen, D
FACS Röhrchen	BD Pharmingen, Heidelberg, D

3.2.4 *Cell-Sorting* mit dem Zellsortiersystem des Zellsortierservice am Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München

Tab. 3.10 Reagenzien

Fluoreszenzantikörper

CD27-APC Antikörper	Fa. Becton Dickonson, New Jersey, USA/Heidelberg, D
IgD-FITC Antikörper	
CD19-PE Antikörper	

Tab. 3.11 Geräte

Zellsorter MoFlow	Cytometation Freiburg, D
-------------------	--------------------------

3.2.5. RNA-Extraktion mit der Chloroform-Ethanol-Methode

Tab. 3.12 Reagenzien

Trizol® Reagenz	Invitrogen, Kalsruhe, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D

Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Ethanol 75 %	Merck, Darmstadt, D
RNAse freies Wasser	Qiagen, Hilden, D

Tab. 3.13 Geräte

Zentrifuge	Heraeus fresco, ThermoScientific, Dreieich, D
NanoDrop	PeqLab GmbH, Erlangen, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

3.2.6 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Tab. 3.14 Reagenzien

Reverse Transkriptase, AMV	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTP (10 mM) Mix	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNAse Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
AMV Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

Tab. 3.15 Geräte

Thermocycler	Thermo Life Science AB, Schweden
--------------	----------------------------------

3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion, *Polymerase-chain-reaction* (PCR)

Tab. 3.16 Reagenzien

Primer	MWG, Ebersberg, D
Probes	MWG, Ebersberg, D
MasterMix	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

Tab. 3.17 Geräte

96-well PCR Platte	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
PCR Gerät, ABI PRISM _{TM} 7700 <i>Sequence Detector</i>	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Abdeckfolie	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

3.2.8 *In vitro* Stimulation von B-Zellen

Tab. 3.18 Reagenzien

CD40-Ligand	
IL-4	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-4	PromoCell GmbH, Heidelberg, D
IL-13	PeptoTech EC Ltd., London, UK
IL-13	PromoCell GmbH, Heidelberg, D

IL-21	PeptoTech EC Ltd., London, UK
IL-21	PromoCell GmbH, Heidelberg, D
Medium (RPMI 1640, FCS 10 %, Glutamin 1 %, Penivillin 50 U/ml/Streptavidin 50 U/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Lipopolysaccharid (LPS)	InvivoGen, San Diego, USA
Insekten-Membran Zellen (1:100)	Stuart Tangye, Garvan Institute, Sydney, Australien

Tab. 3.19 Geräte

Brutschrank	Heraeus Instruments, München, D
-------------	------------------------------------

3.2.9 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Tab. 3.20 Reagenzien

<i>Coating Buffer</i> , 0,05 M <i>Carbonate-Bicarbonate</i> , pH 9,6	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
<i>Wash Solution</i> , 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 8,0	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
<i>Blocking (Postcoat) Solution</i> , 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 % BSA, pH 8,0	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
<i>Sample/Conjugate Diluent</i> , 50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 % BSA, 0,05 % Tween 20, pH 8,0	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA

Enzym Substrat, TMB (OPD oder ABTS)	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
<i>Stopping Solution</i> , 2 M H ₂ SO ₄	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
<i>HRP Detection Antibody (Goat anti-Human IgE-HRP conjugate)</i> 1 mg/ml	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
<i>Calibrator Human Anti IgE</i> 18µg/ml	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
<i>Coating Antibody (Goat anti-Human IgE-affinity purified)</i> 1 mg/ml	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA

3.2.10 IgE-Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Technique-ELISPOT

Tab. 3.21 Reagenzien

2 % <i>Milk</i> (200 mg/10 ml PBS)	Roth, Karlsruhe, D
1 % BSA (200 mg/20 ml PBS)	Roth, Karlsruhe, D
0,1 % <i>Tween</i> 20 (50 µl/50 ml PBS)	Sigma, St. Louis, USA
<i>Capture Antibody (purified mouse anti human IgE</i> 5µg/ml PBS (10 µl/ml))	BD Pharmingen, Heidelberg, D
<i>Detection Antibody (Biotin mouse anti human IgE</i> 5 µg/ml PBS/1 % BSA (10 µl/ml))	BD Pharmingen, Heidelberg, D
BCIP/NBT Puffer (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat p-Toluidinsalz /Nitroblautetrazoliumchlorid)	BD Pharmingen, Heidelberg, D

3.3 Methoden

3.3.1 Isolierung von peripheren Blut-mononukleären-Zellen mit Ficoll, *peripher-blood-mononuclear-cells* (PBMCs)

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes können auf Grund ihrer Dichte von anderen Blutbestandteilen getrennt werden. Verdünntes Blut wird über eine Phase Ficoll-Hypaque (Dichte von 1,077 g/Liter) geschichtet. Je zwei mal 10 ml peripheres EDTA-Spenderblut wurden in ein 50 ml Falcon gegeben und mit *Phosphate buffered saline* (PBS) auf 30 ml aufgefüllt. Das Gemisch aus Blut und PBS wurde nach vorsichtiger Zugabe zu Ficoll-Hypaque bei 2100 *rounds per minute* (rpm) 20 min bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation flottieren Zellen mit geringerer Dichte (Lymphozyten und Monozyten) über dem Ficoll, während alle anderen Bestandteile ein Pellet am Boden des Röhrchens bilden. Mononukleäre Zellen können aus der Zwischenschicht („*buffy coat*“) abgenommen und erneut in Medium oder PBS aufgenommen werden. Diese werden nach Gabe in ein neues 50 ml Falcon nochmals mit 1600 rpm 10 min bei RT zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes und Suspension des Pellets in 30 ml PBS erfolgte die letzte Zentrifugation bei 1300 rpm für 5 min bei RT.

3.3.2 Magnetische Zellseparation mit MACS und CD19 *Microbeads*

Um die spezifische Separation mit dem Zellsortierservice am Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München zu beschleunigen und eine Ausbeute mit größerer Reinheit zu erzielen, wurden die PBMCs mit einem „*Magnetic cell sorting System*“ mit *CD19 Microbeads human* vorsortiert. Diese positive

Selektion ergab gegenüber der negativen Selektionsmethode mit indirektem magnetischem *Labeling* deutlich bessere Ergebnisse. Bei letztgenanntem werden alle Nicht-B-Zellen (T-Zellen, NK-Zellen, DCs, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten) mit primärem Reagenz aus Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern markiert. Hierbei handelt es sich um einen Cocktail von Antikörpern gegen CD2, 14, 16, 36, 43, 235a (Glykophorin A). Das zweite Reagenz besteht aus anti-Biotin monoklonalen Antikörpern konjugiert mit *MicroBeads*.

Die positive Selektionsmethode markiert CD19+ Zellen magnetisch mit CD19-*MicroBeads*. Hierfür muss erst die Zellzahl bestimmt werden. Insgesamt können bis zu 10^7 Zellen in 80 μL MACS Puffer resuspendiert werden. Zu dieser Suspension werden 20 μL von CD19-*MicroBeads* hinzugegeben, gut gemischt und anschließend für 15 min bei einer Temperatur von 4-8° C inkubiert. Durch Zugabe von 1-2 mL MACS-Puffer werden die Zellen gewaschen und anschließend bei 1300 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird nun komplett abgesaugt und bis zu 10^8 Zellen können in 500 μL MACS-Puffer erneut aufgenommen werden.

Nun werden die Zellen auf eine MACS-Säule gegeben, die sich in einem magnetischen Feld des MACS-Separators befindet. Die magnetisch detektierten Zellen werden in der Säule zurückgehalten, wohingegen die unmarkierten Zellen durch die Säule hindurch gleiten.

Auto-MACS-Zellseparation wurde 1999 eingeführt und ist ein üblicher Standard bei der Sortierung von Zellen. Es ermöglicht dem Benutzer schnelle, automatische und saubere Zellsortierung. Die Benutzung des Auto-MACS™ Separator mit dem Programm für positive Selektion „possel“ hat in unserem Ansatz zu erheblich besserer Ausbeute an separierten Zellen geführt, als durch manuelle Trennung der Zellpopulationen möglich war.

3.3.3 Fluoreszenz-aktiviertes-Zellsortieren, *Fluorescence-activated-Cell-Sorting* (FACS)

Mit der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie ist der Nachweis von Antigenen auf Zelloberflächen und im Zellinneren möglich. Durch eine Markierung von Oberflächenantigenen mit Fluoreszenzfarbstoffen ist die genaue Bestimmung des Zelltyps möglich. Teilweise ist eine Kombination der geeigneten Antikörper notwendig, wobei auf die Interaktionen von kombinierten Farbstoffen zu achten ist. Hier eignen sich Farbstoffe, wie z. B. Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Diese Fluorochrome absorbieren im ultravioletten Spektrum und emittieren längerwelliges Licht im sichtbaren Bereich, welches vom FACS gemessen wird und als Spot auf einem Diagramm sichtbar wird. FITC erscheint grün, PE rot. Ebenso ist ein indirekter Nachweis mit Doppelmarkierung möglich. Hierbei wird ein „Erstantikörper“, welcher an das Antigen bindet, mit einem fluoreszenzmarkierten „Zweitantikörper“ nachgewiesen.

Beim Durchflusszytometer werden Zellen durch eine vibrierende Fließkammer Zelle für Zelle an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Hier messen Photomultiplikatoren die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärtslichtstreuung korreliert mit der Größe der Zellen, die seitliche Lichtstreuung (im 90° Winkel gemessen) mit der Granularität bzw. dem Plasma/Kern-Verhältnis der Zellen. Mit Hilfe dieser zwei Parameter ist zu Anfangs die Auswahl der zu untersuchenden Zellpopulation möglich. Es lassen sich große Zellen, wie Granulozyten mit großer Kern-Plasma-Relation und granuliertem Zytoplasma von kleinen Zellen mit hohem Kernanteil abgrenzen. Lymphozyten zählen zu dieser Population. Im Anschluss macht man sich das Prinzip der Fluoreszenz zu Nutze. Somit lassen sich die vorselektierten Zellsubpopulationen noch weiter voneinander abgrenzen. Die Antigendichte auf der Zelloberfläche korreliert in

etwa mit der Intensität der Fluoreszenz und wird durch Photomultiplikatoren quantitativ ermittelt. Durch diese Methode werden Zell-Populationen je nach Antigenexpression voneinander abgegrenzt. Die visuelle Darstellung erfolgte über *Dotplot*-Darstellungen.

Färben der Zellen und Messung

Zur Zellfärbung mit Antikörpern diente eine Platte mit 96 Vertiefungen (*96-well* Platte) mit dem Einsatz von 20µl pro *well*. Dieses Volumen enthielt je nach Ausbeute nach der B-Zell-Isolation mittels MACS unterschiedliche Zellzahlen. Die gesamten Reaktionsschritte erfolgten auf Eis zur Optimierung der Versuchsbedingungen. Darüber hinaus mussten die Antikörper vor Licht geschützt werden, um eine photochemische Inaktivierung der fluoreszierenden Farbstoffe zu vermeiden.

Zu den Zellsuspensionen wurden die Antikörper mit einem Volumen von jeweils 10 µl hinzugegeben und gut resuspendiert.

Während der Inkubationszeit von 20 min in Dunkelheit und auf Eis wurde in FACS Röhren 1 ml PBS Puffer vorgelegt. Nach dem Waschen mit jeweils 100 µL PBS pro *well* wurden die Platten 2 min bei 1400 rpm und RT zentrifugiert, bevor sie erneut einem Waschschrift unterzogen wurden. Im Anschluss konnten die Zellen mit der bereits vorgelegten Flüssigkeit in die Röhren aufgenommen werden und entweder mit dem FACS Gerät qualitativ und quantitativ analysiert werden oder der weiteren Prozedur des Zellsortierens in naive B-Zellen und *memory* B-Zellen unterzogen werden.

Die Analysen in dieser Arbeit wurden auf dem Gerät der Fa. Becton Dickinson, New Jersey, USA bzw. Heidelberg FACSCalibur mit vier Kanälen durchgeführt. Zur Auswertung diente die Software *Cellquest*.

Um die Messungen zu eichen, zu kalibrieren und die individuellen Messbedingungen optimal anzupassen, wurden stets eine ungefärbte

Negativkontrolle und Einzelfarbstoffkontrollen mitgeführt und diese zu Beginn der Messung einer Kompensationskontrolle unterzogen, mit dem Ziel, dass die ungefärbte Probe keine Signale gab und die gefärbten Kontrollen nur den jeweiligen Farbspektrumsbereich anzeigten. Dies ist bei der Färbung mit mehreren Farben von großer Bedeutung, um die Signale der doppeltgefärbten Zellen zu verifizieren. Zur Quantifizierung der einzelnen Populationen diente eine graphische Auswertung mittels Quadranten.

3.3.4 „Cell-Sorting“ mittels MoFlow® - Zellsortiersystem des Zellsortierservice am Hämatologikum des Helmholtz Zentrums München (nach Ellwart, 2000)

Der Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierer sollte Massenanreicherungsverfahren, wie einer Separation mit magnetischen oder paramagnetischen *Beads* vorgezogen werden, da im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation eine große Reinheit (98 %-100 %) der Zielpopulation erforderlich war. Außerdem mussten Populationen getrennt werden, die eine sehr geringe Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche haben. Zudem erleichtert die Methode mittels *Cell-Sorter* das Vorgehen bei Sortierungen nach vielen Farben. Üblicherweise werden die Zellen durch den Sortiervorgang nicht geschädigt, vorausgesetzt, Temperatur und pH-Wert stimmen und es handelt sich um ein geeignetes Zellmedium. Meist sind mehr als 95% der Zellen nach der Sortierung intakt. Maximale Reinheit von 99 % bis 100 % der sortierten Zellen kann in einem Sortierschritt erreicht werden, wenn die Größe der Zielzellpopulation über 10 % beträgt. Ist diese über 1 %, übersteigt die Sortierreinheit im Allgemeinen 95 %. Die Reinheit der sortierten Fraktion hängt stark von der Stabilität des Flusszytometers ab. Weitere Faktoren, wie der Zelltod, Verlust durch Adhärenz der Zellen an den Röhrchenwänden, Anteil des Zelldebris aus abgestorbenen Zellen, präzise

Einstellung und Stabilität des Flußzytometers beeinflussen die Ausbeute. Auch die Art der Sortierung, Anreicherungs- oder eine Reinsortierung, ist von Bedeutung.

Seltene Ereignisse unter 1 % Zielzellen können ebenso sortiert werden, aber darunter leiden Reinheit und Ausbeute. Deswegen wurde die Konzentration der Zielzellen vor Sortierbeginn durch eine vorangehende Anreicherungs-sortierung mittels *MACS-Sorting* erhöht (Ellwart, 2000).

Sortierprinzip (Ellwart, 2000):

Prinzip der Zellsortierung mit Hilfe eines abreißenden Flüssigkeitsstrahls:

Die Einzelzellsuspension der Zellen nach B-Zell-Isolation mittels MACS mit Anti-CD19 *MicroBeads*, wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Färbung erfolgte nach dem auch beim FACS erläuterten Schema. Hierbei wurden die Fluoreszenzfarbstoffe CD27-APC, IgD-FITC und CD19-PE benutzt. Nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung werden Zellen durch eine Düse gepresst und die jeweiligen Fluoreszenzen mit Hilfe von Anregung durch Laserlicht gemessen. Die mehrparametrischen Werte werden mittels Histogramm am Bildschirm dargestellt. Druckschwankungen auf den Flüssigkeitsstrahl bewirken ein Abreißen mit Tröpfchenbildung. Durch positive oder negative Ladung kann die Zelle nach rechts oder links sortiert werden (Ellwart W., 2002). Nun stehen die sortierten Zellpopulationen zur RNA-Extraktion und cDNA-Synthese für die anschließend stattfindende PCR zur Verfügung. Die Ergebnisse wurden mit der Software Summit 4.1 ausgewertet.

3.3.5 RNA-Extraktion mit der Chloroform-Ethanol-Methode

Um die RNA aus den gewünschten Zellen zu extrahieren, wurden die Zellen nach der Zellsortierung in einem sterilen 1,5 mL Eppendorf *Tube* in 1 ml Trizol® aufgenommen und bei -20 °C eingefroren. In Trizol ist Guanidiniumthiocyanat enthalten, das zur Auflösung von Zellmembranen und Proteindenaturierung führt. Dabei werden auch RNAsen zerstört, nicht aber die RNA selbst. Um die RNA nicht zu gefährden, war es von besonderer Bedeutung, stets unter RNase-freien Bedingungen zu arbeiten und die Versuche immer auf Eis durchzuführen. Nach dem Auftauen wurden die Proben zunächst geschüttelt (vortexen), bevor jeweils 200 µL Chloroform den Proben zugesetzt wurden. Anschließend wurden die Proben für 20 Sekunden kräftig geschüttelt, um eine Phasentrennung zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Eppendorf *Tubes* bei 11200 rpm für 5 min zentrifugiert und es kam dabei zu der eben erwähnten Phasentrennung in eine RNA-haltige, wässrige Phase über einer DNA-haltigen Phenol-Phase, welche durch die Proteinbande getrennt waren. Die wässrige, durchsichtige RNA-Phase wurde als Überstand abgenommen und in ein neues steriles 1,5 mL Eppendorf *Tube* überführt. Zur gewonnenen Phase wurde nun 500 µL Isopropanol gegeben, gut gemischt und 10 min bei RT inkubiert, bevor die Probe erneut bei 11200 rpm 10 min zentrifugiert wurde. Diesmal erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C. Um noch verbliebene Salze zu entfernen, wurde das Pellet insgesamt zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und jeweils 10 min bei 11200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Ethanol-Überstand soweit wie möglich abgenommen, ohne Austrocknen des Pellets zu riskieren. Abschließend wurde das Pellet in 20 µL RNase freiem Wasser aufgenommen. Die genaue quantitative Messung erfolgte auf Grund der geringen Ausbeute am RNA-Messgerät „Nano Drop®“, welches auch noch kleinste RNA-Mengen detektieren kann. Auf photometrischen Messprinzipien basierend können

Messungen innerhalb von 10 Sekunden auch mit geringem Probenvolumen von 1 µl bei einem breiten Messbereich von 2-3500 ng/µl durchgeführt werden ohne den zusätzlichen Gebrauch von Lösungen, Küvetten oder Kapillaren. Zum Schluss konnte die RNA bei -80 °C weggefroren werden.

3.3.6 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase, AMV

Damit die gewonnene RNA für die anschließende PCR eingesetzt werden kann, musste diese zunächst in DNA umgeschrieben werden.

Dieser Vorgang erfolgte mit dem Enzym Reverse Transkriptase, AMV (*avian myeloblastosis virus*). Dieses Enzym aus dem Myeloblastose Virus dient der cDNA-Synthese aus der isolierten RNA der B-Lymphozyten. Bei einem gesamten Reaktionsvolumen von 20 µL je Reaktions *Tube* wurden 10,2µl RNA, 0,8µL Reverse Transkriptase, AMV, 1µL RNase-Inhibitor, 2µL poly-(dt)-15-Primer, 2 µL dNTP-Mix 10 mM und 4 µL AMV-Puffer zur Reaktion eingesetzt. Daraus ergaben sich je nach gemessener RNA-Konzentration unterschiedliche cDNA-Mengen. Im darauffolgenden Schritt der PCR wurden dann die Konzentrationen der einzelnen Proben durch Verdünnung so aneinander angeglichen, dass bei jeder PCR-Einzelreaktion die gleiche cDNA-Menge zum Einsatz kam.

Bei der cDNA-Synthese wird selektiv nur die mRNA der eingesetzten RNA erkannt und der Transkription unterzogen. Der Unterschied zu anderen RNA-Formen (rRNA der Ribosomen, tRNA (Transfer-RNA) zur Übertragung von Aminosäuren) besteht in der sogenannten Poly-A-Sequenz aus mehreren Adenin-Basen. Für die spezifische Erkennung sind die poly-(dt)-Primer aus Thymidin-Basen zuständig. Sie docken der Basenpaarung nach Watson und Crick entsprechend (Watson und Crick, 1953) an den RNA-Strang an und ermöglichen so den Beginn der cDNA-Synthese. Durch diesen Hybridisierungsschritt wurde die doppelsträngige Ansatzstelle für das Enzym

Reverse Transkriptase, AMV geschaffen, welches nun den RNA-Strang entlang die hinzugegebenen Desoxy-Nukleotide basenkomplementär anknüpft und somit einen cDNA-Strang synthetisiert. Um die RNA zu schützen und die gesamte Länge der cDNA zu optimieren, wurde wiederum nicht nur unter RNase-freien Bedingung und auf Eis gearbeitet, sondern auch RNase-Inhibitor zum Reaktionsgemisch gegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte im PCR-Cycler der Firma Thermo Life Science.

Die Ansätze wurden zur Primeranlagerung 10 min bei 25°C inkubiert, im Anschluss eine Stunde auf 42 °C gehalten, um der Reversen Transkriptase optimale Bedingungen zu gewährleisten und danach 5 min bei 99 °C denaturiert. Nach Beendigung wurde die synthetisierte cDNA bei 4 °C gekühlt und konnte anschließend in der PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

3.3.7 Polymerase-Kettenreaktion, *Polymerase chain reaction* (PCR)

Prinzip der PCR

Die 1983 von Kary Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion erlaubt es, spezifische DNA-Sequenzen in kurzer Zeit enorm zu vervielfältigen. Zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes werden lediglich zwei *Primer* benötigt, die diese Sequenz einschließen, eine hitzeresistente DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) und die vier DNA spezifischen dNTPs. Durch genaue Auswahl der *forward* und *reverse Primer* können die gewünschten DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Durch die drei Phasen - Erhitzung zur Trennung der DNA-Doppelstränge, Abkühlung zur Anlagerung der *Primer* („*annealing*“) und folgender Elongation durch die Polymerase - entstehen in exponentieller Geschwindigkeit bei bis zu 45 Zyklen Doppelstränge des DNA-Abschnitts zwischen den *Primern*. Die DNA denaturiert bei 95 °C, woraufhin sich die

Oligonukleotid-*Primer* an die gewünschte Amplifikationssequenz der Matrize anlagern. Hierfür wird eine kalkulierte *Annealing*-Temperatur von 40-60 °C benötigt, gefolgt von finaler DNA-Synthese durch die hitzestabile Taq-Polymerase (Elongation) bei ca. 70 °C.

Real Time PCR (modifiziert nach Schild, Applied Biosystems GmbH)

Mit Hilfe der *Real-Time-PCR* ist auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR basierend, die quantitative Ermittlung von DNA-Amplifikationen möglich. Mit Hilfe der Messung von emittierter Fluoreszenz kann auf die Menge der PCR-Produkte zurückgeschlossen werden (Saiki et al., 1985, Sambrook et al., 1989), wobei sich ein direkt proportionales Verhältnis ergibt (Heid et al., 1996). Die gewünschte DNA-Sequenz wird dabei mit einem Kontrollgen („*Housekeeping*“-Gen) verglichen, um einen Referenzwert für die quantitative Bestimmung zu ermitteln. Am Ende eines Laufes herrschen in der exponentiellen Phase die optimalen Reaktionsbedingungen für die quantitative Bestimmung der Reaktionsprodukte (Holzapfel et al., 2007, Pfaffl et al., 2004, Bustin et al., 2009). Eine Alternative zur *real-time-PCR* ist die quantitative Bestimmung der PCR-Produkte mittels gelelektrophoretischer Auftrennung, wobei jedoch dieses semiquantitative Verfahren erst nach Ablauf der PCR erfolgen kann.

1991 beschrieb Holland et al. ein 5'-Nuclease-PCR-Assay, welches die 5'-Exonukleaseaktivität der TaqPolymerase ausnützt. Hierdurch ist die Messung der Amplifikation nach jeder spezifischen Sequenz möglich (Holland et al., 1991). Bevor Lee et al. 1993 von der Fa. Applied Biosystems® fluorogene Sonden entwickelten, war sehr aufwändiges *post-PCR-Processing* mit ³²P-markierten Sonden notwendig (Lee et al., 1993). Als entscheidende Erneuerung zu dem ursprünglichen 5'-Nuclease-Assay wird zwar weiterhin die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase benutzt, jedoch mit speziellen fluorogenen Sonden. Diese sind aus einem Oligonukleotid

zusammengesetzt mit einer Carboxyfluorescein (FAM)-Markierung am 5'-Ende als *Reporter* und einer Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)-Markierung am 3'-Ende als sog. *Quencher*, der zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert ist. Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt bei Anregung mit der Wellenlänge von 488 nm wegen der räumlichen Nähe vom *Reporter* die Fluoreszenz des *Quenchers*. Zunächst hybridisiert die Sonde mit den *Primern* am Matrizen-Strang, von welchem sie in der Extensionsphase beim Antreffen der Taq-Polymerase unter Bildung einer Y-förmigen Sekundärstruktur verdrängt wird. Diese Konformitätsänderung aktiviert die AmpliTaq-DNA Polymerase, welche mit Hilfe ihrer 5'-3'-Aktivität die Sonde schneidet. Sondenhydrolyse bewirkt die Entstehung von räumlicher Nähe zwischen *Reporter* und *Quencher*. Nun kommt es proportional zur Entstehung der PCR-Produkte zur Steigerung der Fluoreszenz. Die 100 %-Bindung der passenden Sonde garantiert die hohe Sequenzspezifität. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors (Schild, Applied Biosystems GmbH). Alle TLRs wurden mit dieser klassischen Taqman Technik gemessen, die Methode mit dem fluoreszierenden Farbstoff SYBR® Green fand bei den hier aufgeführten Ergebnissen keine Anwendung.

Tab. 3.21 Zusammenfassung der Daten der fluoreszenten Farbstoffe, die bei der TaqMan® PCR eingesetzt werden (R = *Reporter*, Q = *Quencher*)

Farbstoff	Chemische Bezeichnung	Typ	Anregung (nm)	Emission (nm)
FAM	6-Carboxy-Fluorescein	R	488	518
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin	Q	488	582
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	R	488	602

Die *Real-Time*-PCR wurde mit einem Volumen von 25 μL pro *well* durchgeführt, wobei jeweils 12,5 μL TaqMan® Universal MasterMix Puffer, 3,5 μL *Primer*-Mix aus *forward* und *reverse Primer* in einer Verdünnung von 1:10 mit Wasser, 2 μL *Probe* und 7 μL cDNA zum Einsatz kamen. Die 7 μL cDNA wurden entsprechend den Ausgangskonzentrationen so verdünnt, dass jeder Reaktionsansatz mit einer definierten cDNA-Menge von 10 ng stattfand. Der Mastermix enthält AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase, dNTPs mit dUTP, MgCl_2 (5 mM Endkonzentration), ROX (passiver Referenzfarbstoff) und eine Uracil-N-Glycosylase. MgCl_2 kommt neben seiner Funktion als essentieller Co-Faktor der AmpliTaq DNA-Polymerase-Enzymfunktion eine weitere Bedeutung für die Höhe eines positiven Signals zu, da es einen großen Einfluss auf effiziente Anbindung der Sonden während der *Annealing/Extension*-Reaktion besitzt.

Die Inkubation gestaltete sich wie folgt:

Zunächst ein Zyklus bei 50 °C für 2 min, damit die Uracil-N-Glycosylase die Hydrolyse Uracil-haltiger PCR-Produkte bewirken kann, anschließend ein weiterer Zyklus bei 95 °C für 10 min, um die Inaktivierung der Glycosylase, die Denaturierung der verdauten DNA-Proben und die Aktivierung der Polymerase zu gewährleisten. Anschließend folgten 45 Zyklen bei 60 °C je 1 min für *Annealing* und *Extension* und die Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden.

Alle PCR-Proben wurden zur internen Qualitätskontrolle zweifach untersucht, außerdem wurden als weitere Kontrolle NTCs (*No Template Controls*) mitgeführt. Die Reagenzien stammten von Applied Biosystems und die *Primer* und *Probes* wurden von der Fa. MWG, Ebersberg bezogen.

Mit dem C_T -Wert („*Threshold Cycle*“) können anhand einer exponentiellen Kurve die Ergebnisse analysiert werden. Unter dem C_T -Wert versteht man eine theoretische Größe, die den Beginn des exponentiellen Wachstums einer Kurve kennzeichnet. Die Quantifizierung der DNA wurde relativ, also im Vergleich zur

Expression des *Houskeeping* Gens Glycerin-Aldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ermittelt.

Tab. 3.22 *Primersequenzen* der TLRs für die TaqMan® PCR

Gen	<i>Forward Primer Sequenz</i>	<i>Reverse Primer Sequenz</i>
GAPDH	5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
TLR 1	5'CAGTGTCTGGTACACGCATGGT-3'	5'TTTCAAAAACCGTGTCTGTTAAGAGA-3'
TLR 2	5'GGCCAGCAAATTACCTGTGTG-3'	5'AGGCCGGACATCCTGAACCT-3'
TLR 3	5'CCTGGTTTGTTAATTGGATTAACGA-3'	5'TGAGGTGGAGTGTTGCAAAGG-3'
TLR 4	5'AGTTTCCTGCAATGGATCAAGG-3'	5'CTGCTTATCTGAAGGTGTTGCAC-3'
TLR 5	5'TGCCTTGAAGCCTTCAGTTATG-3'	5'CCAACCACCACCATGATGAG-3'
TLR 6	5'CCCATTCCACAGAACAGCAT-3'	5'ATAAGTCCGCTGCGTCATGA-3'
TLR 7	5'TTAACCTGGATGGAAACCAGCTA-3'	5'TCAAGGCTGAGAAGCTGTAAGCTA-3'
TLR 8	5'TTATGTGTTCCAGGAACTCAGAGAA-3'	5'TAATACCCAAGTTGATAGTCGATAAGTTTG-3'
TLR 9	5'GGACCTCTGGTACTGCTTCCA-3'	5'AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT-3'
TLR 10	5'TGTTATGACAGCAGAGGGTGATG-3'	5'GAGTTGAAAAAGGAGGTTATAGGATAAATC-3'

Tab. 3.23 *Probes* der TLR-Sequenzen für Taqman®PCR

Gen	<i>Probe</i>
GAPDH	5'FAM-CAAGCTTCCC GTTCTCAGCC-3'TAM
TLR1	5'FAM-TGCCCATCCAAAATTAGCCCGTTCC-3'TAM
TLR2	5'FAM-TCCATCCCATGTGCGTGGCC-3'TAM
TLR3	5'FAM-ACCCATACCAACATCCCTGAGCTGTCAA-3'TAM

TLR4	5'FAM-AGGCAGCTCTTGGTGGAAGTTGAACGA-3'TAM
TLR5	5'FAM-ACCCATACCAACATCCCTGAGCTGTCAA-3'TAM
TLR6	5'FAM-CCCAACAAGTACCACAAGCTGAAGGCT-3'TAM
TLR7	5'FAM-AGAGATACCGCAGGGCCTCCCG-3'TAM
TLR8	5'FAM-TGATTTCCAGCCCCTGATGCAGC-3'TAM
TLR9	5'FAM-ACGATGCCTTCGTGGTCTTCGACAAA-3'TAM
TLR10	5'FAM-TGACCCCAGCCACAACGACACT-3'TAM

3.3.8 In-vitro Stimulation von B-Zellen

Um die grundlegende Absicht dieser Arbeit zu ermöglichen, nämlich die Abhängigkeit der Expression von TLRs im Zusammenhang mit dem Ig-Klassenswitch zu IgE-produzierenden B-Zellen darzustellen, wurden die mittels MACS isolierten B-Zellen jeweils für 3, 6, bzw. 9 Tage mit verschiedenen Stimulationsansätzen inkubiert. Der Überstand wurde nach der jeweiligen Inkubationszeit abgenommen und einem IgE-ELISA unterzogen. Die stimulierten Zellen wurden nach Ende der Inkubation mit Antikörpern angefärbt und mittels FACS analysiert.

Der Isotypenswitch wird normalerweise durch Interaktion von naiven B-Zellen, Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, FDCs und DCs kontrolliert. Der Switch erfolgt über 2 Signale: CD40Ligand (CD40L) und spezielle Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13, IL-21, INF- γ und *transforming growth factor* β (TGF- β)) können in-vitro den Wechsel zur Produktion von IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA und IgE durch aktivierte humane naive B-Zellen bewirken. Die Überstände wurden jeweils nach 3, 6 bzw. 9 Tagen abgenommen und mittels ELISA auf IgE untersucht. In dieser Arbeit wurden die B-Zellen nach folgenden Schemata kultiviert:

Tab. 3.24 Übersicht über die Kultivierungsschemata der B-Zellen

	Med.	CD40L (1µg/ml)	Insect Mebran 1:100 CD40L	IL-4 (400 U/ml)		IL-21 (25 ng/ml)		IL-13 (25 ng/ml)	
Fa				R+D	Promo Cell	Pepto Tech	Promo Cell	Pepto Tech	Promo Cell
1	*****								
2	*****	*****							
3	*****		*****						
4	*****	*****		*****					
5	*****	*****		*****		*****			
6	*****	*****		*****		*****		*****	
7	*****	*****			*****				
8	*****	*****			*****		*****		
9	*****	*****			*****		*****		*****
10	*****		*****	*****					
11	*****		*****	*****		*****			
12	*****		*****	*****		*****		*****	
13	*****		*****		*****				
14	*****		*****		*****		*****		
15	*****		*****		*****		*****		*****
16	*****	*****		*****			*****		*****
17	*****	*****			*****	*****		*****	
18	*****		*****	*****			*****		*****
19	*****		*****		*****	*****		*****	

3.3.9 *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA)

(Protokoll nach dem Hersteller Bethyl Laboratories, Montgomery, USA)

Mit einem *Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay* (ELISA) kann IgE auch noch in kleinsten Mengen nachgewiesen werden. Die Messung erfolgt mit dem Zellkulturüberstand, in welchem das vorhandene IgE mit dem Primärantikörper (*capture antibody*) reagiert, welcher fest am Boden in einer Mikrotiterplatte haftet. Selbst in Pikogramm-Mengen detektiert dieses hoch sensitive Verfahren noch IgE. Nach dem Sandwichprinzip, welches auch im klinisch-standardmäßigen Einsatz beim HIV-ELISA Anwendung findet, bindet der enzymgekoppelte Sekundärantikörper (*detection antibody*) ebenso an das IgE. Die IgE-Menge wird mittels katalysierter Farbreaktion bestimmt. Die Messung erfolgt durch Photometrie anhand einer standardmäßig geeichten Kalibrierungskurve.

Humaner IgE-ELISA (nach dem Protokoll des Herstellers)

Der Enzym-Immuno-Assay zur quantitativen Bestimmung von Gesamt-IgE in humanem Serum oder Plasma ist ein „Sandwich-ELISA“. Die jeweiligen Kavitäten (*wells*) sind am Boden mit Anti-human-IgE beschichtet. Zu Beginn werden im ersten Inkubationsschritt das Gesamt-IgE aus dem Zellkulturüberstand gebunden und überschüssige Komponenten durch Waschen entfernt. Die Bestimmung des Gesamt-IgE erfolgt über einen HRP-konjugierten Primärantikörper unter Bildung festphasengebundener Anti-IgE-IgE-Konjugat-Komplexe. Nach einem erneuten Waschschrift bewirkt die Zugabe des HRP-Substrates 3, 3', 5, 5'-Tetra-Methyl Benzidin (TMB) die Bildung eines blauen Farbstoffs. Schwefelsäure vermag die enzymatische Reaktion zu stoppen, was durch einen Farbumschlag nach gelb sichtbar wird. Die IgE-

Konzentration der Patientenprobe ist proportional zur ermittelten optischen Dichte (OD).

Zur Ermittlung der Werte dienen bekannte IgE-Konzentrationen, die regelmäßig kalibriert werden. Mittels dieser Standardkurve können die unbekanntes Patienten-IgE-Konzentrationen bestimmt werden.

Tab. 3.25 Standardkurve *Human-IgE-Quantitativ-ELISA-kit* Catalog. No. E80-108

Konzentration ng/ml	Absorption 450 nm	kalkulierte Konzentration
1000	1,851 1,826	975,97
500	1,528 1,568	522,87
250	1,149 1,150	249,78
125	0,720 0,762	113,99
62,5	0,562 0,511	70,99
31,25	0,279 0,268	30,34
15,6	0,139 0,143	14,78

Da im ELISA nicht die erwarteten IgE-Mengen nachgewiesen werden konnten, erfolgte zur internen Kontrolle zudem der IgE-Nachweis mittels IgE-ELISPOT.

3.3.10 *IgE-Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Technique* (ELISPOT) (etabliertes Laborprotokoll nach Herstellerangaben)

Der ELISPOT (*Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Technique*) dient der Ermittlung der Freisetzung von Antigenen und Antikörpern. Durch ein Enzym, welches fähig ist, ein Farbstoffsubstrat umzusetzen, ist die Visualisierung von Antikörpern und Zytokinen am Boden einer 96-Well-Mikrotiter-Platte möglich. Das Farbstoffsubstrat ist an einen zweiten Antikörper gebunden und die zu detektierenden Substanzen erscheinen als kleine rote oder blaue Punkte. Die Auswertung durch eine Software erfolgt mittels automatischer Zählung und lässt somit Rückschlüsse auf die spezielle Aktivität der Immunzellen zu.

Für den IgE-ELISPOT müssen die Platten mit 70 % Ethanol für 30 Sekunden bei RT inkubiert werden. Nach dem Auskippen und Trockenklopfen werden diese dreimal mit PBS 100 µl gewaschen, anschließend der *Capture* Antikörper „*anti-human-IgE* (5 µg/ml) PBS (10 µl/ml)“ dazugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag muss die Platte ausgeschüttet, trocken geklopft und gewaschen werden, bevor sie mit 100 µl/well *Milk* (2 %) für 2h bei RT dem *Blocken* unterzogen wird. Nach erneutem Auskippen, Trocknen, Klopfen und Waschen werden 100 µl der Zellsuspension zugefügt und wiederum über Nacht unter 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Die Platte darf jetzt nicht mehr bewegt oder geschüttelt werden. Zum Schluss erfolgt am Tag 2 noch die Zugabe des *Detection* Antikörpers „*Biotin mouse anti-human-IgE* (5 µg/ml) PBS/1 % BSA“ (10 µl/ml). Nach erneuter Inkubation unter CO₂ Zusatz bei 37 °C für 1h 30 min und Waschen wird alkaline Phosphatase (AKP) Streptavidin 1:1000 in PBS/1 % BSA hinzugefügt und abermals für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nun erfolgt die Zugabe von BCIP/NBT Puffer mit anschließender Inkubation für max. 15 min. Jetzt kann nach dem Waschen der „Gummi“- Boden abgezogen werden. Die Spots erscheinen nach einer Nacht im Kühlschrank schärfer.

4. Ergebnisse

Um die Differenzen in der Expression von TLRs bezüglich naiver und *memory* B-Zellen herauszufinden, wurden, wie bereits im Methodenteil beschrieben, zunächst die PBMCs aus peripherem Blut mittels Ficoll isoliert und anschließend eine B-Zell-Separierung mit MACS durchgeführt.

Anschließend konnten die mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC, PE und APC markierten Zellen der Zellisolierung mittels MoFlow® zugeführt werden.

4.1 Zellzahlen der naiven und *memory* B-Zell-Fraktion nach Zellseparation mittels MoFlow®

In der folgenden Tabelle werden die Gesamtzellzahlen der beiden B-Zell-Populationen nach B-Zell-MACS und *Cell Sorting* mittels MoFlow® dargestellt. Die Zellzahl wurde direkt beim Sortieren im Flowzytometer ermittelt und entstammt bei allen Spendern einer Gesamtmenge von 100 ml peripher venösem Blut.

Tab. 4.1 Zellzahl der naiven und *memory* B-Zellen nach der Separation

Probe	IgD /CD19 + naive B-Zellen	CD27+/ CD19+ <i>memory</i> B-Zellen
1, SU	$2,3 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^4$
2, OR	$1,4 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^4$
3, KE	$4,4 \cdot 10^5$	$5,7 \cdot 10^4$
4, TH	$3,3 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^4$
5, PD	$2,1 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^4$
6, RN	$1,9 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^4$

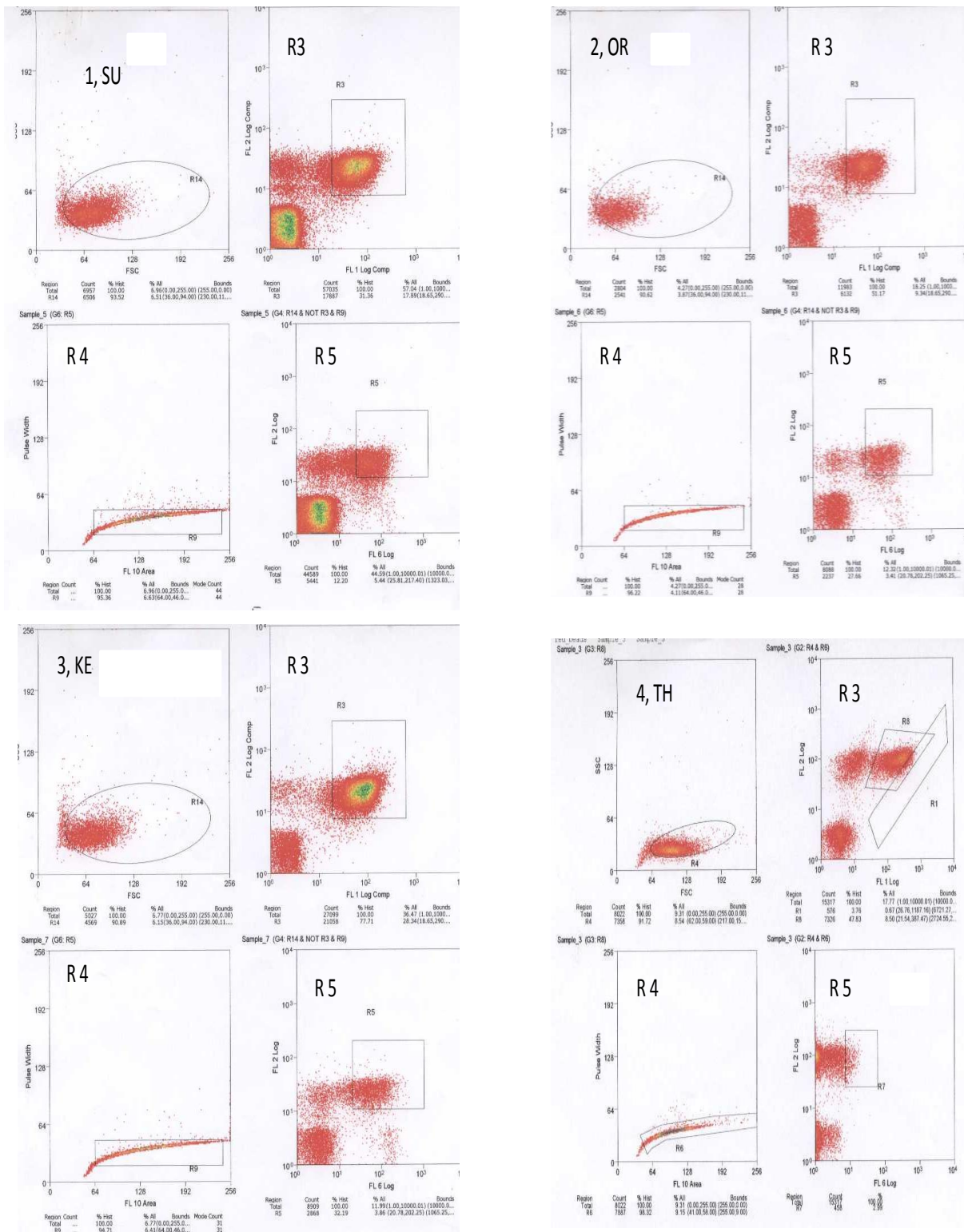
7, EH	$1,4 * 10^5$	$7,0 * 10^3$
8, TB	$1,1 * 10^5$	$1,5 * 10^4$
9, RC	$1,0 * 10^6$	$7,5 * 10^4$
10, KS	$5,5 * 10^4$	$7,3 * 10^3$
11, FA	$3,1 * 10^5$	$1,3 * 10^4$
12, BS	$1,3 * 10^6$	$5,4 * 10^5$
13, BAS	$6,1 * 10^5$	$6,6 * 10^5$
14, CS	$5,8 * 10^5$	$6,1 * 10^5$
15, MS	$4,1 * 10^5$	$1,7 * 10^5$
16, LB	$5,1 * 10^5$	$1,6 * 10^5$
17, SZ	$5,3 * 10^5$	$7,6 * 10^4$
18, SS	$1,2 * 10^6$	$6,2 * 10^4$
19, CMS	$8,1 * 10^5$	$5,6 * 10^4$
20, PS	$5,6 * 10^4$	$4,5 * 10^3$

Im Durchschnitt überwiegen die Zellzahlen der naiven B-Zellen mit Werten um $1-4 \cdot 10^5$ Zellen. Die Fraktionen der *memory* B-Zellen ergaben geringere Werte mit Zellzahlen um $1 \cdot 10^4 - 6 \cdot 10^5$. Unterschiede in den Zellzahlen sind auf methodische Ungenauigkeiten, sowie auf die Gesamtzellzahlen der verschiedenen Spender zurückzuführen. Um in der folgenden PCR valide Ergebnisse zu erzielen, wurden die mit CD27-APC und gleichzeitig IgD-FITC markierten Zellen eliminiert, um eine eindeutige Zuordnung zu jeweils einer der beiden Populationen zu ermöglichen.

Beim Zellseparieren wurden im Rahmen der Lasereinstellungen und der Kompensationseinstellungen die zu sortierenden Zellen mit Punktdiagrammen (*Dot Plot*) sichtbar gemacht. Die Ordinate in den folgenden Abbildungen gibt die Informationen über Zellgröße und die Abszisse wiederum Auskunft über die Granularität des Zytoplasmas.

In den folgenden Abbildungen werden die graphischen Darstellungen der Zellseparation gezeigt.

Abb. 4.1 Dot Plot Darstellung der B-Zellsortierungen Patienten 1-10



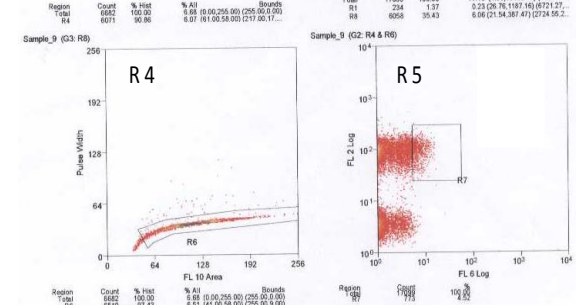
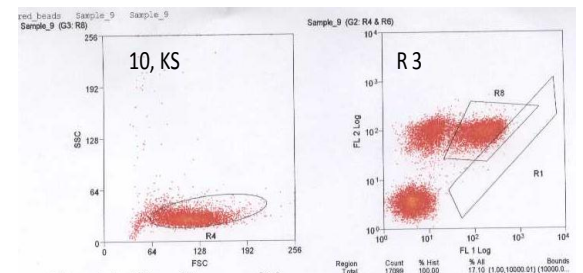
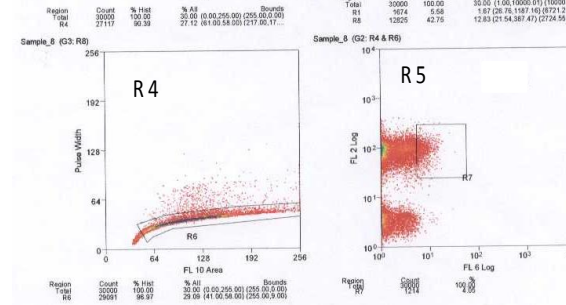
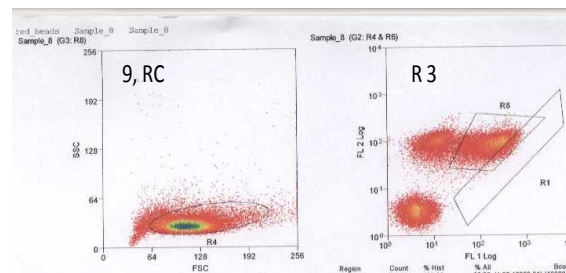
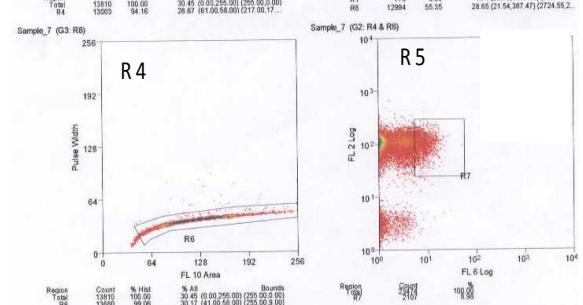
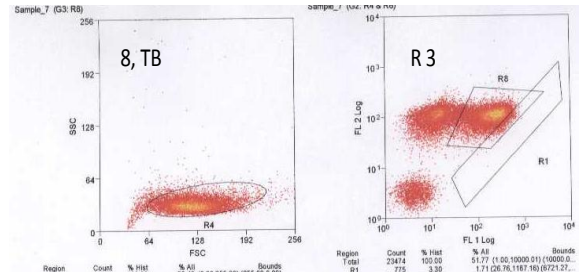
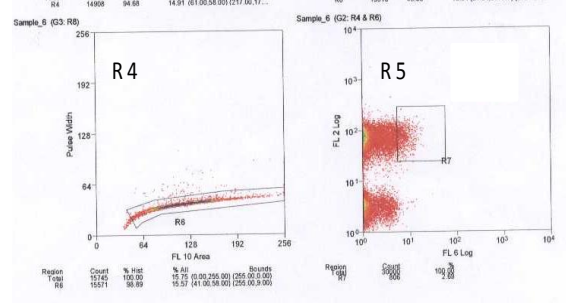
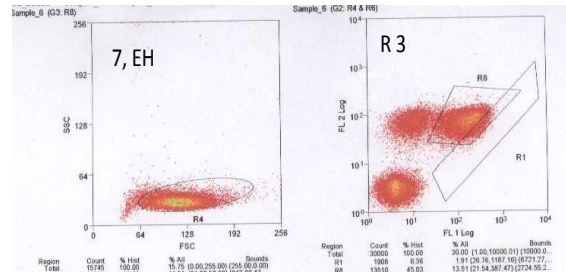
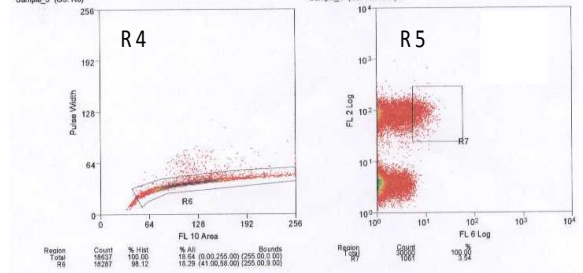
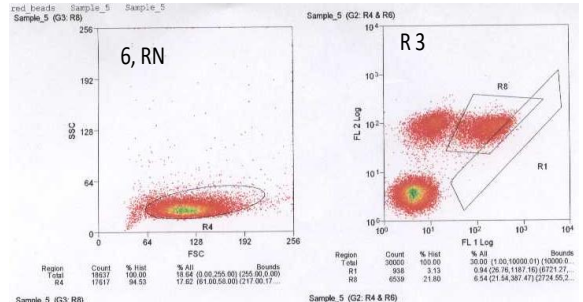
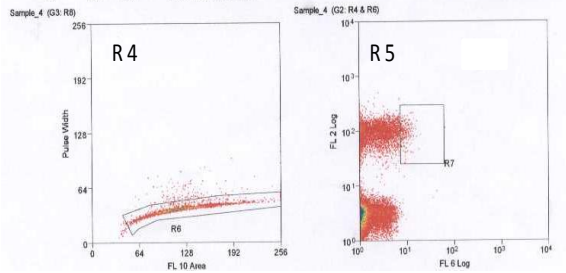
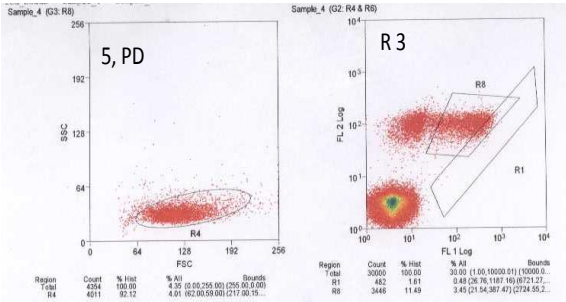
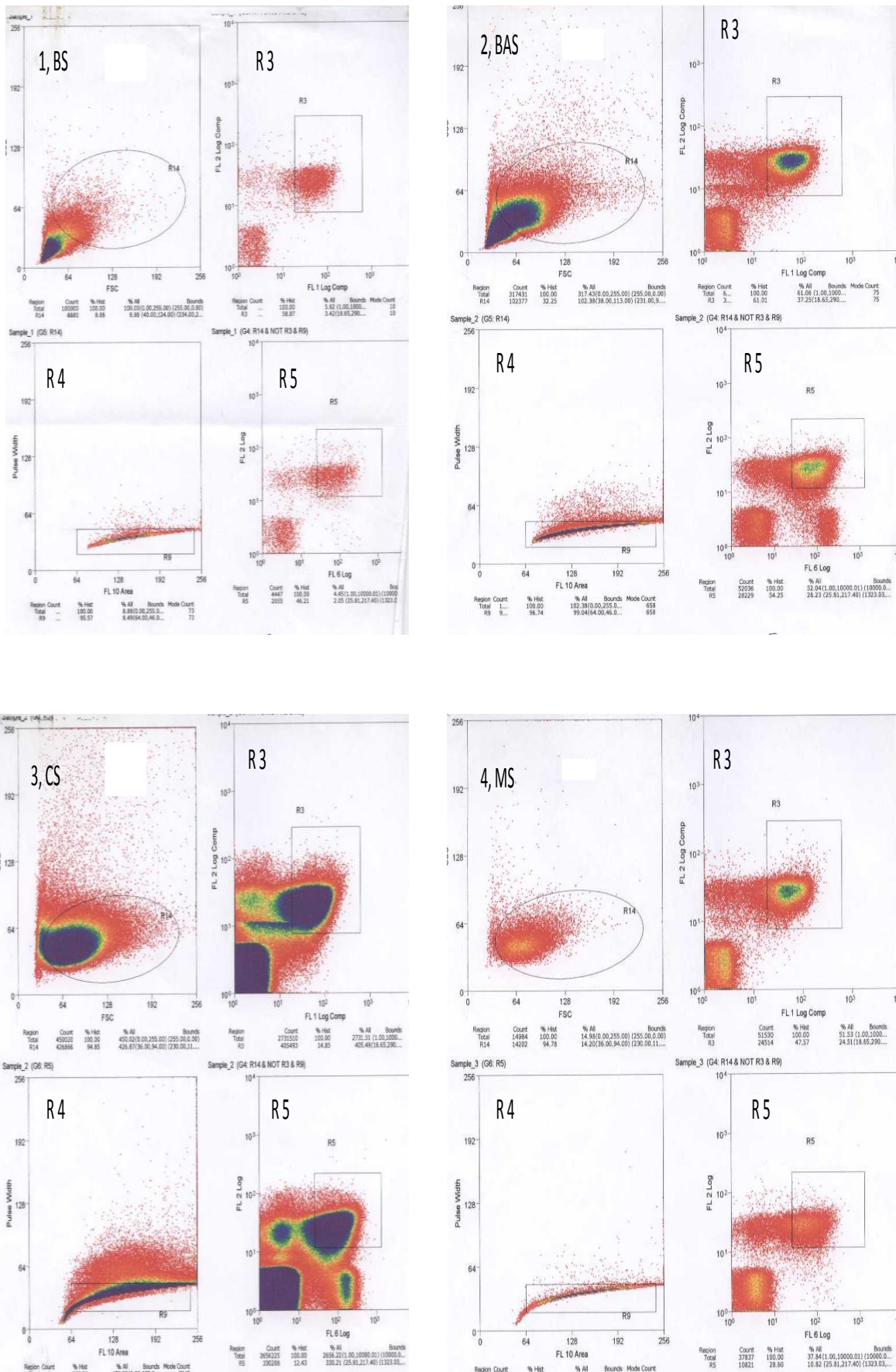
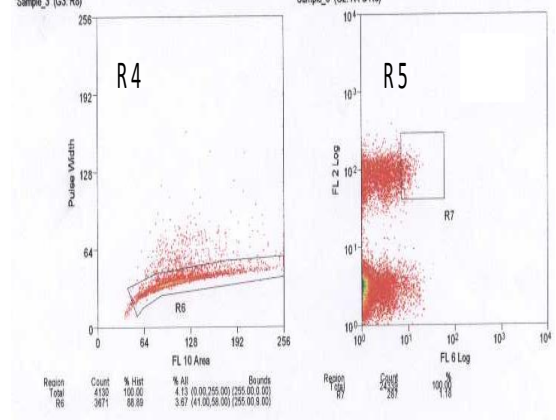
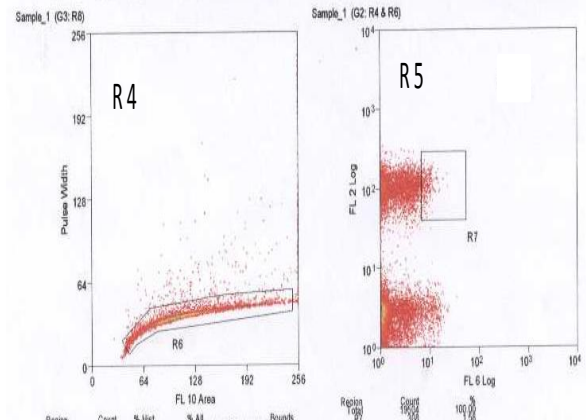
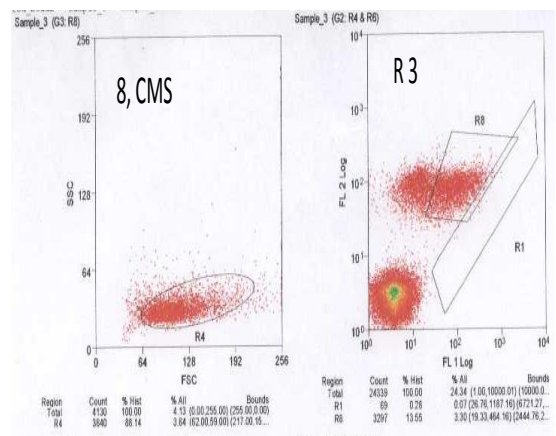
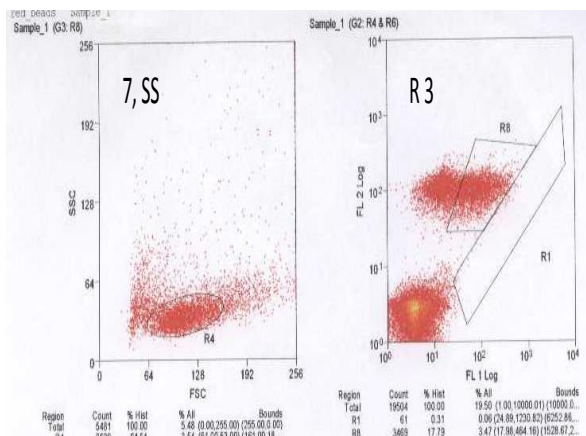
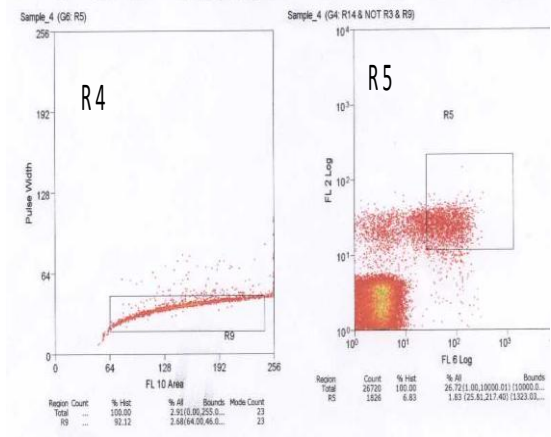
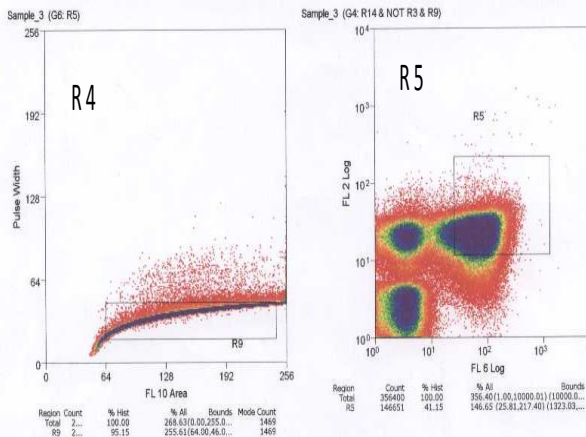
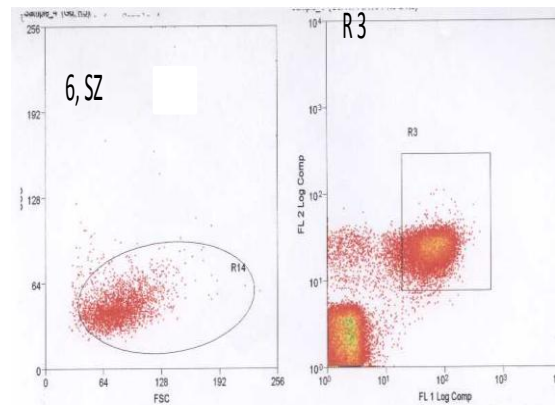
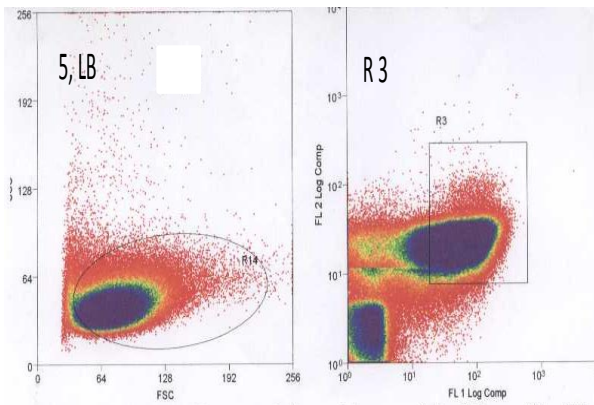
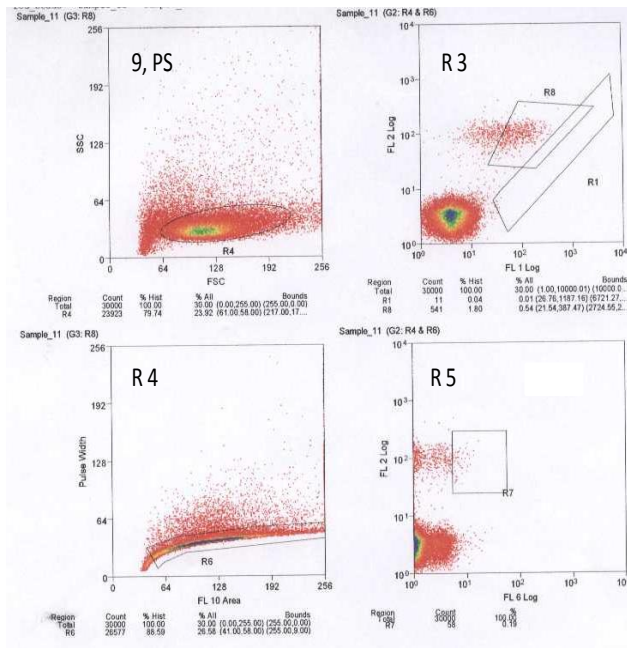


Abb. 4.2 Dot Plot Darstellungen der B-Zellsortierungen Kontrollen 1-9







Um die zu sortierende Zellpopulation zu ermitteln, wurde zunächst, wie bereits beim FACS bekannt, der „forward scatter“, Auftreffrichtung, (FSC) gegen den „sidescatter“, 90° Winkel, (SSC) aufgestellt. Mit dem Gate R4 wurde die Gesamtpopulation der zu sortierenden Zellen ausgewählt, abgestorbene Zellen und anderer „Zellschrott“ wurden so dem Sortieren entzogen. Zelldoublets besitzen eine größere Pulsweite im Sinne der Pulsweitenmodulation (PWM) als einzelne Zellen, da sie längere Zeit benötigen, den Laserstrahl zu passieren. Daher werden diese ebenfalls aus dem Sortieren ausgeschlossen. Dies ist in der Abbildung durch das Gate R9 gezeigt. Gate R3 und Gate R5 zeigen die Zellen die mit den Farbstoffen PE, FITC und APC markiert wurden. Dabei wurden im Kanal FL2 Zellen die CD19-PE-markierten Zellen detektiert, beim Kanal FL1 registrierte der Farblaser die FITC-markierten Zellen und der Kanal FL6 galt den CD27-APC-markierten Zellen. Somit ergab das Gate R3 die zu sortierende Zellpopulation der naiven IgD+/CD19+ B-Zellen und Gate R5 zeigt die zu sortierenden Zellen der memory CD27+/CD19+ B-Zellen.

4.2 RNA-Mengen nach RNA-Extraktion bei sortierten naiven und *memory* B-Zellen

Im Anschluss an das Sortieren wurden die Zellen in Trizol suspendiert, RNA gewonnen und diese zur PCR-Analyse in cDNA umgeschrieben. Am Ende der RNA-Extraktion wurde diese in 50 μ L RNase-freies Wasser aufgenommen und mit dem Nano Drop photometrisch gemessen.

Tab. 4.2 Folgende Tabelle stellt die Werte der RNA-Extraktion dar.

Probe	IgD /CD19 + naive B-Zellen			CD27+/ CD19 + <i>memory</i> B-Zellen		
	1. Wert (ng/ μ l)	2. Wert (ng/ μ l)	Mittelwert (ng/ μ l)	1. Wert (ng/ μ l)	2.Wert (ng/ μ l)	Mittelwert (ng/ μ l)
1, SU	9,73	10,00	9,87	8,89	9,23	9,06
2, OR	6,63	6,70	6,67	9,30	9,78	9,54
3, KE	17,64	16,73	17,19	10,46	8,41	9,45
4, TH	9,15	8,49	8,82	32,11	31,89	32,00
5, PD	8,12	8,00	8,06	18,03	17,17	17,6
6, RN	29,32	28,28	28,8	5,94	7,93	6,94
7, EH	10,54	11,83	11,86	9,07	7,20	8,14
8, TB	12,12	9,67	10,90	11,16	10,82	10,99
9, RC	18,60	18,89	18,75	12,79	12,85	12,82
10, KS	11,82	12,87	12,35	16,73	16,89	16,81
11, FA	11,23	11,49	11,36	12,39	13,83	13,11
12, BS	12,68	12,84	12,7	7,13	9,04	8,09

13, BAS	7,21	9,57	8,39	6,37	6,67	6,52
14, CS	10,50	9,51	10,01	18,82	18,52	18,67
15, MS	13,75	12,66	13,21	5,63	6,06	5,85
16, LB	16,10	14,63	15,37	19,14	19,82	19,48
17, SZ	23,05	24,24	23,65	25,92	24,33	25,13
18, SS	15,20	15,11	15,16	13,08	14,38	13,73
19, CMS	26,25	25,68	25,97	11,53	12,12	11,83
20, PS	20,55	24,02	22,29	27,29	28,48	27,89

4.3 RT-PCR - Expression von TLR1-10 bei Patienten und Kontrollen bezüglich naiver und *memory* B-Zellen

Bei der PCR wird mittels quantitativer Methoden die relative Transkription im Vergleich zur GAPDH-Expression untersucht. Man misst die Menge der vorhandenen, konstitutiv exprimierten mRNA. Im Folgenden ist das Plattenschema dargestellt, nach welchem die 96-*well*-PCR-Platten bestückt wurden, um die Expression der TLRs auf den jeweiligen Zellen zu ermitteln. Für valide Ergebnisse wurden stets *Doublets* gemessen. Da im zentralen Bereich der Platte konstante Temperaturen herrschen, wurden Außenbereiche nicht besetzt, um größere Differenzen bei den Doppelwerten zu vermeiden.

Tab. 4.3 PCR-Schema auf 96-well-PCR-Platte:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C		TLR1	TLR 1	TLR 2	TLR 2	TLR 3	TLR 3	TLR 4	TLR 4	TLR 5	TLR 5	
D		TLR 6	TLR 6	TLR 7	TLR 7	TLR 8	TLR 8	TLR 9	TLR 9	TLR 10	TLR 10	
E		TLR 1	TLR 1	TLR 2	TLR 2	TLR 3	TLR 3	TLR 4	TLR 4	TLR 5	TLR 5	
F		TLR 6	TLR 6	TLR 7	TLR 7	TLR 8	TLR 8	TLR 9	TLR 9	TLR 10	TLR 10	
G		GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	NTC						
H												

NTC= Non template control

Es wurde in jedem *well* mit 10 ng DNA pro Ansatz gearbeitet. C2-11 und D2-11 wurden mit DNA der B-Zellen aus der CD27+/CD19+ *memory* Fraktion bestückt, E2-11 und F2-11 wurden mit DNA der IgD+/CD19 positiven naiven B-Zellen belegt. In G2-5 erfolgte jeweils der GAPDH-Standard und in G6 wurde eine NTC durchgeführt. Es wurde für jede Probe der 10 Patienten und 9 Kontrollen eine separate PCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bezüglich des Gens GAPDH in Relation gesetzt und die Werte mittels Excel Tabelle graphisch dargestellt. Von den *Doublets* wurde der Mittelwert gebildet und dieser in der zu berechnenden Formel als Exponent des negativ dekadischen Logarithmus gesetzt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den PCR Versuchen aufgeführt:

Abb. 4.3 TLR-Expression-Überblick naive B-Zellen Patienten und Kontrollen

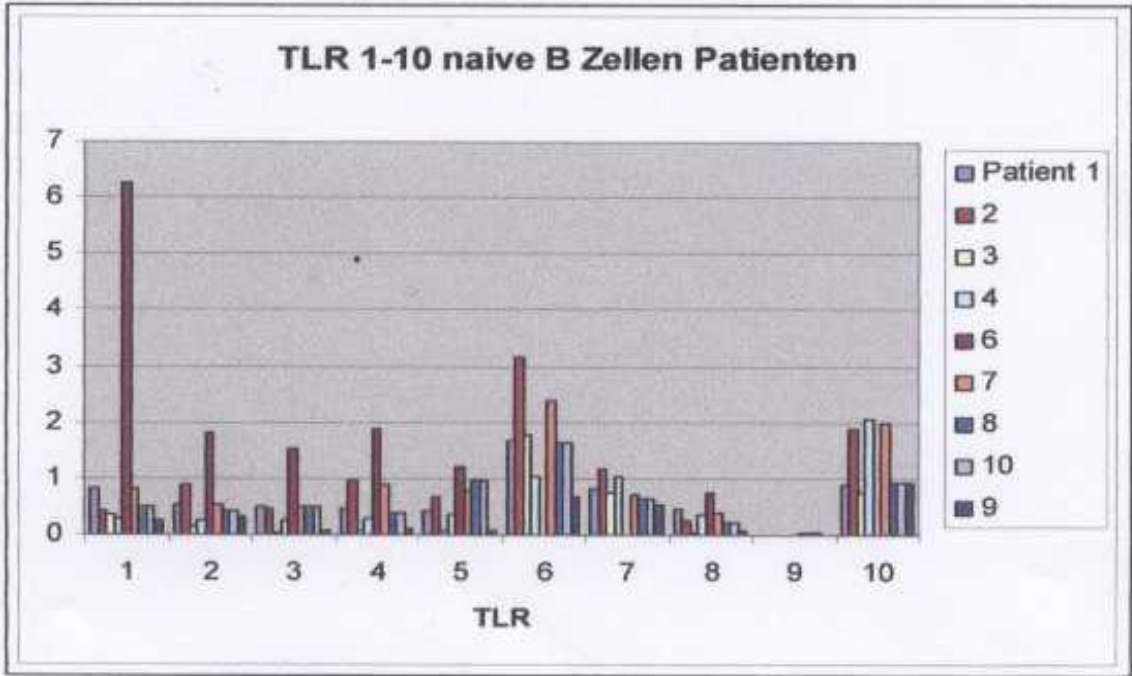
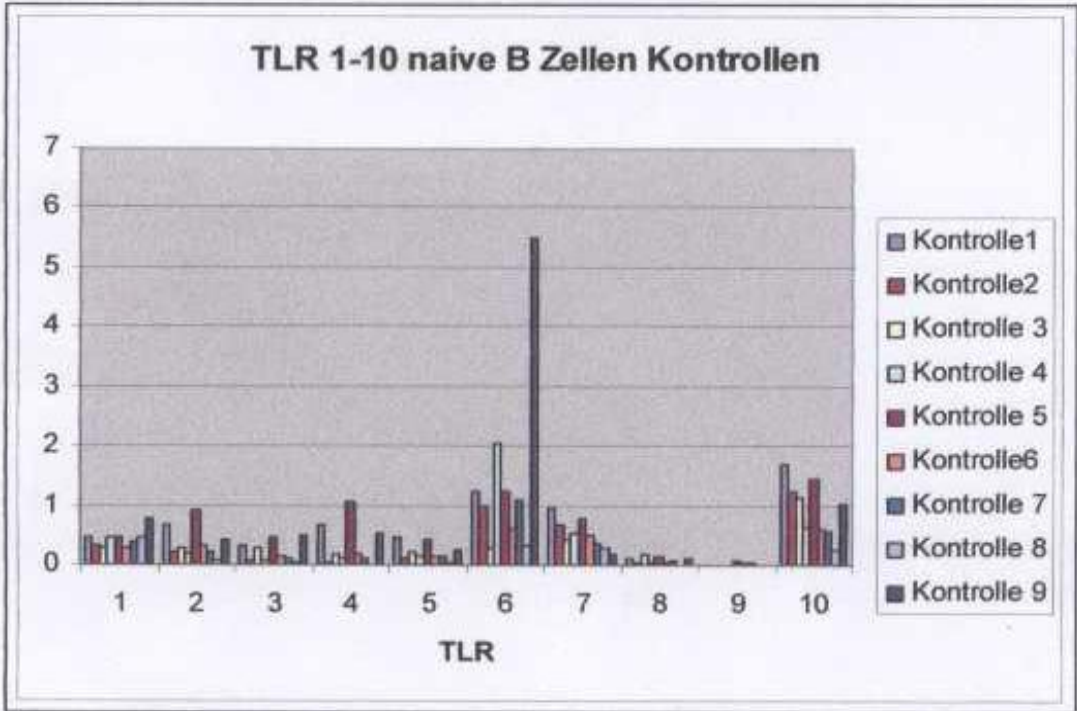
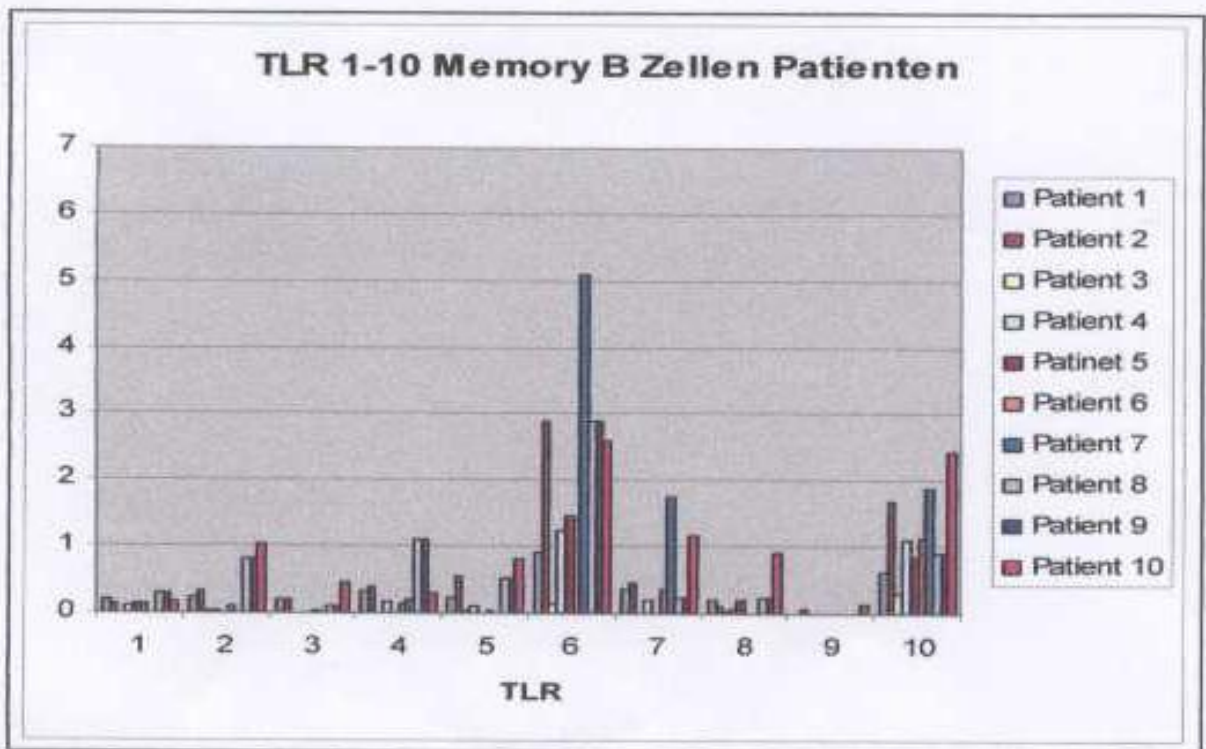
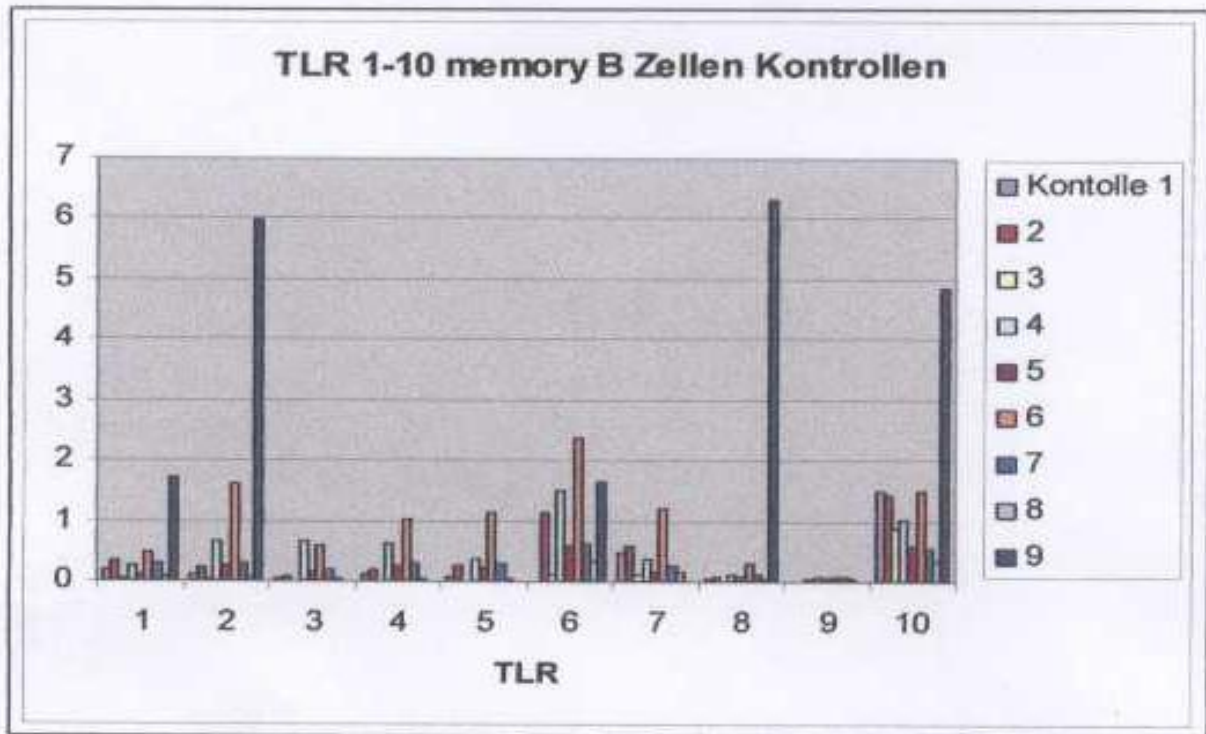


Abb. 4.4 TLR-Expression - Überblick *memory* B-Zellen Patienten und Kontrollen



Nun wurden die einzelnen Patienten und Kontrollen in den folgenden Graphiken separat bezüglich ihres TLR-Expressionsmusters analysiert.

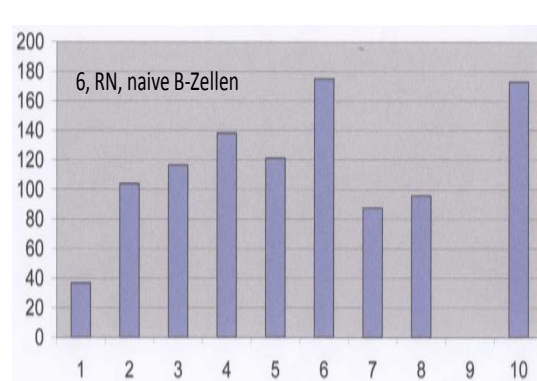
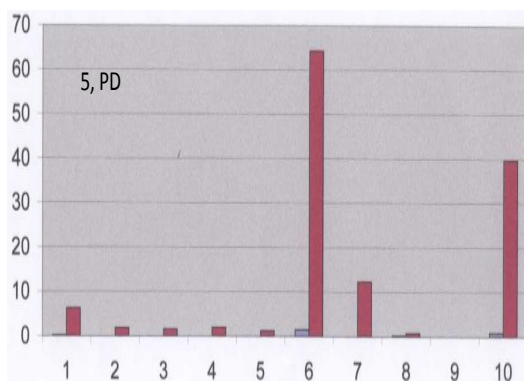
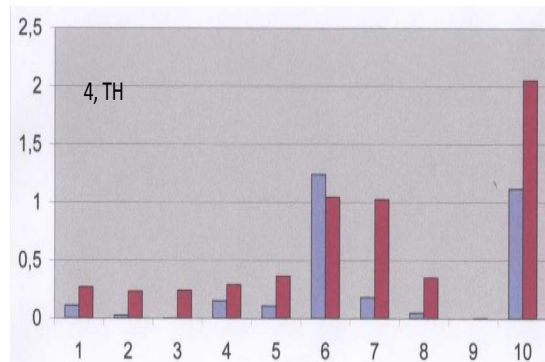
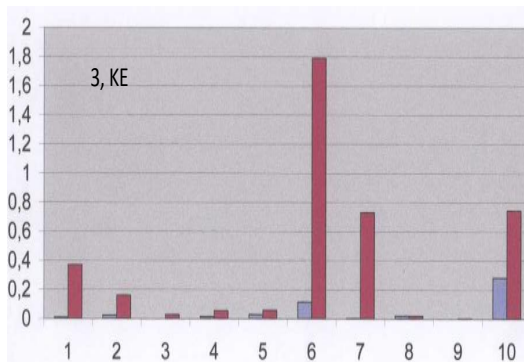
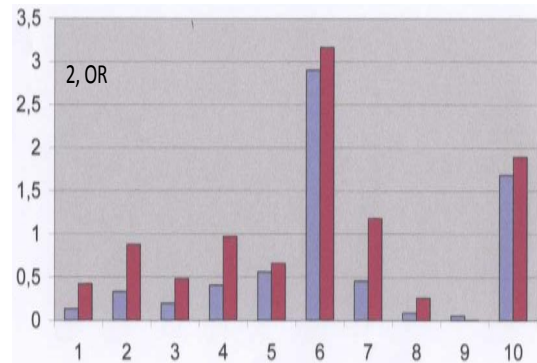
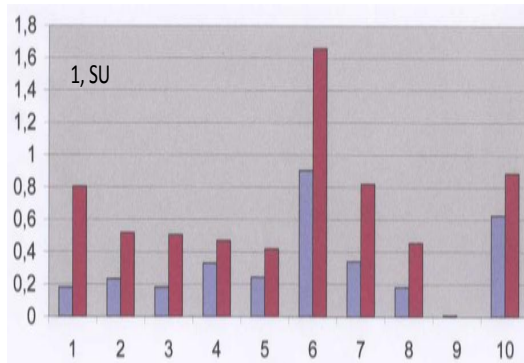
Abb. 4.5 Graphische Darstellung der TLR-Expressionen Patienten 1-10

X- Achse: TLR1-10

Y- Achse: $2^{-\Delta CT}$

blaue Balken: memory B-Zellen

rote Balken: naive B-Zellen



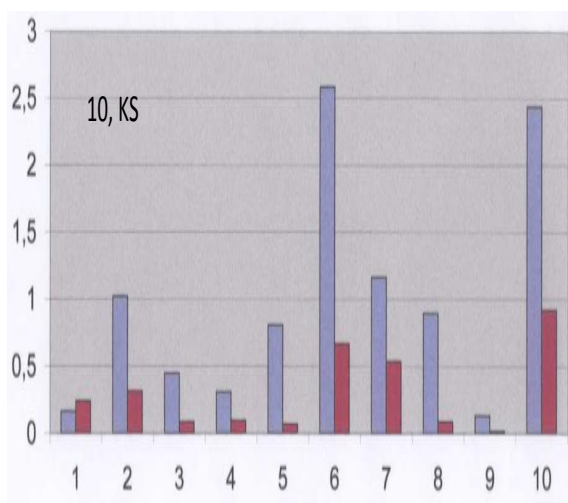
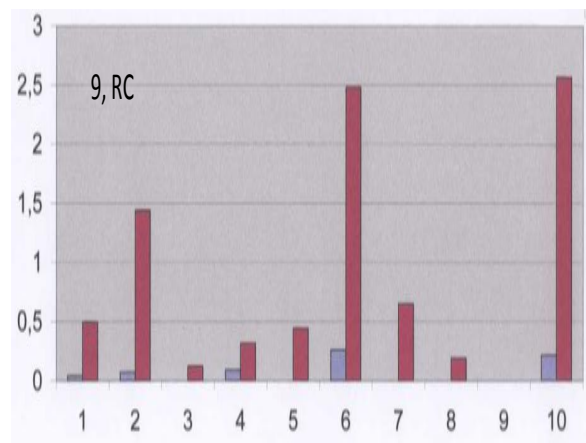
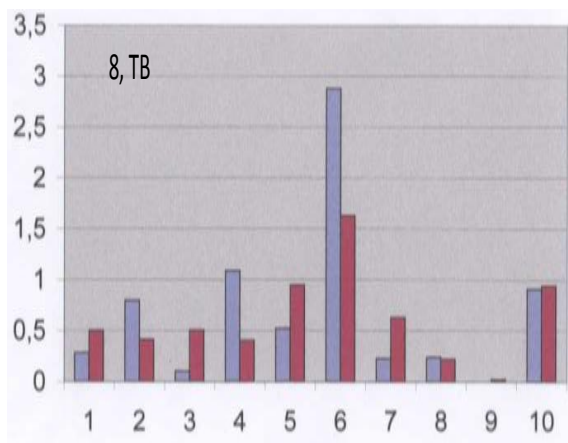
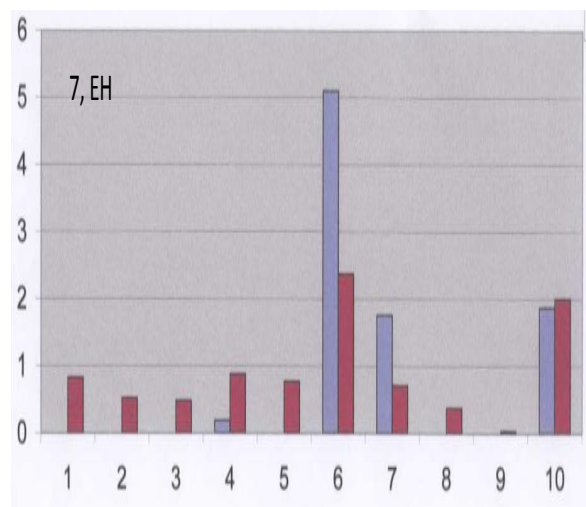
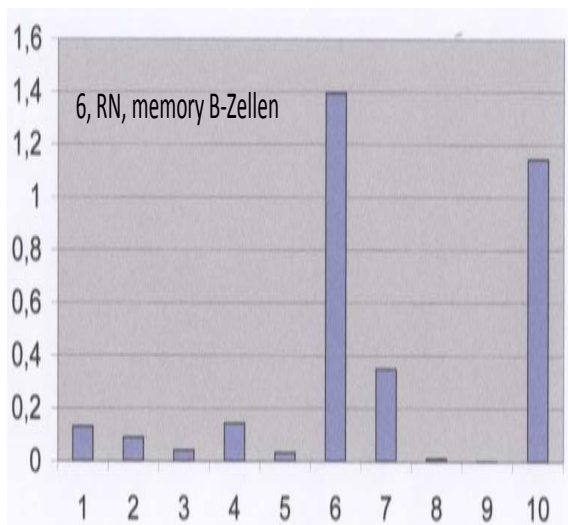
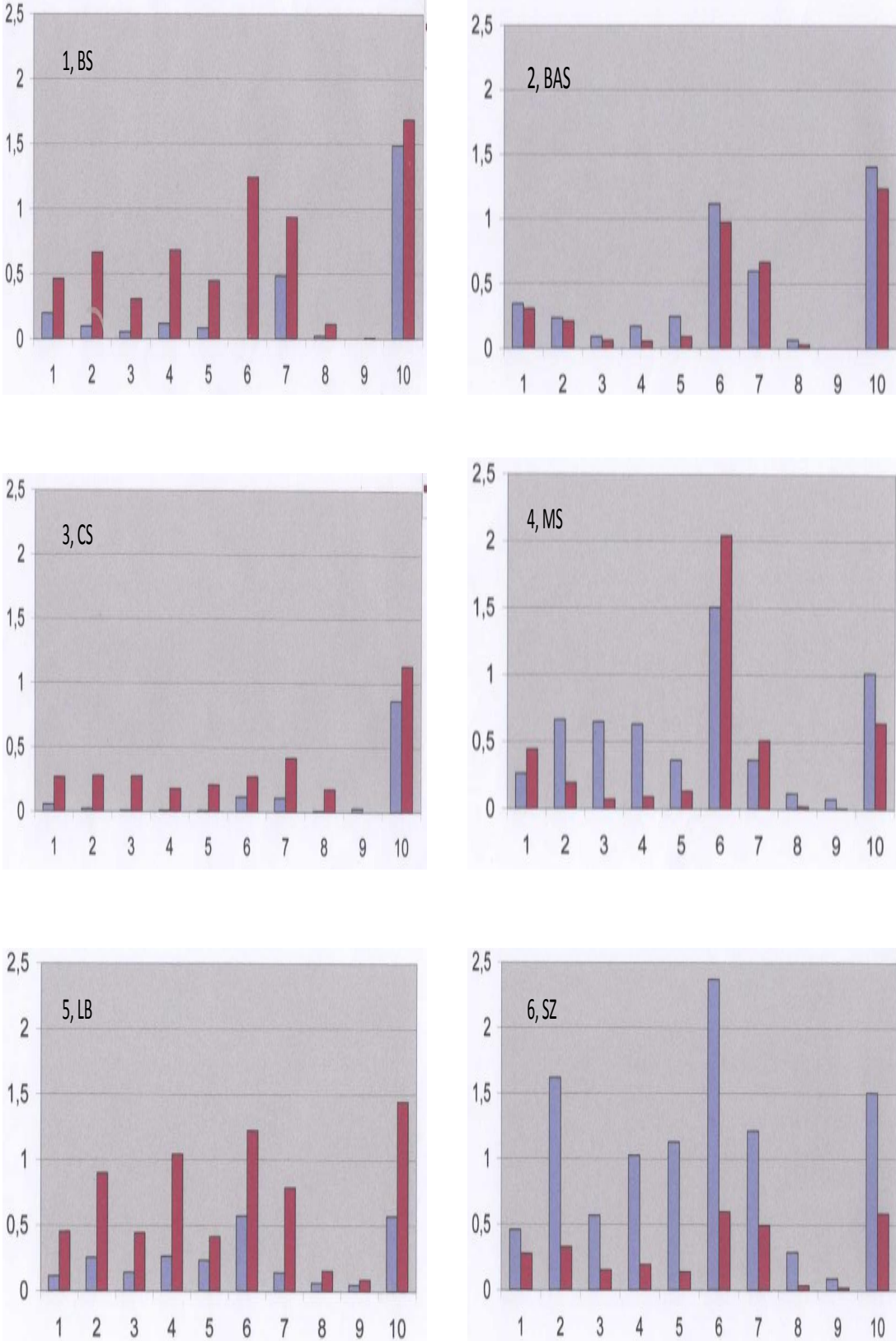
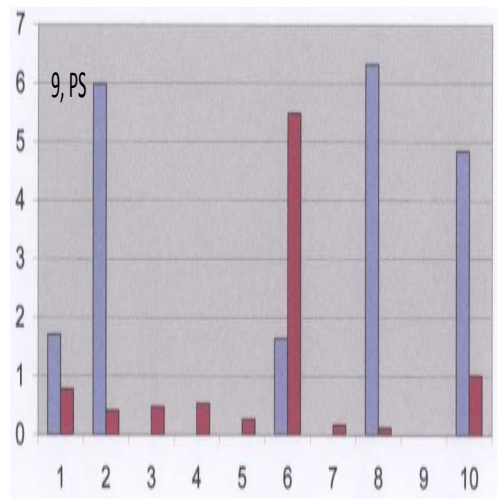
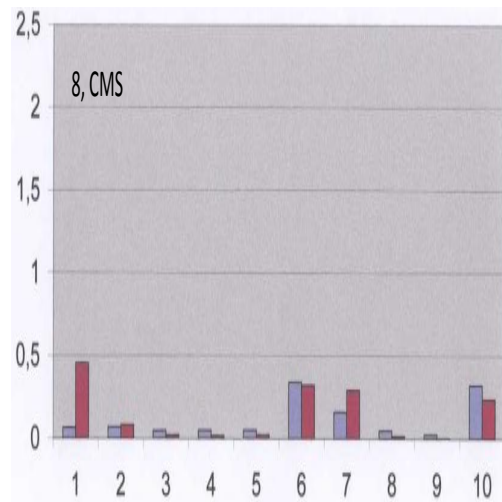
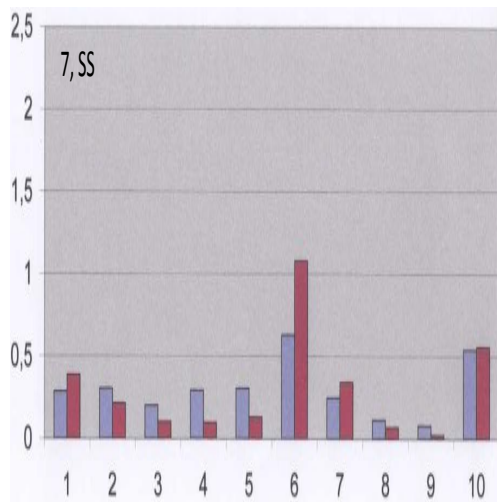


Abb. 4.6 Graphische Darstellung der TLR-Expressionen Kontrollen 1-9





Es wurden alle TLRs auf *memory* und naiven B-Zellen exprimiert. Zwischen Patienten und Kontrollen konnte kein nennenswerter Unterschied ermittelt werden. Die verhältnismäßige Expression ist bei Kontrollen und Patienten, sowie bei naiven und *memory* B-Zellen jeweils nahezu identisch. Besonders stark wurde TLR6, TLR7 und TLR10 exprimiert, gefolgt von TLR1, TLR2, TLR3 und TLR4. TLR8 zeigte sich nur sehr gering und überraschenderweise konnte für TLR9 nur eine relativ geringe Expression gemessen werden. Die naiven B-Zellen zeigten ein etwas größeres quantitatives Expressionsmuster im Vergleich zu den *memory* B-Zellen.

4.4 Stimmulationsansätze zum Ig-Klassenswitch zu IgE-proliferierenden B-Zellen mit ELISA und ELISPOT-Messung

In Bezug auf die beschriebenen Stimmulationsansätze mit anschließender Ig-Messung mittels ELISA und ELISPOT konnten leider keine positiven Ergebnisse gezeigt werden. In beiden Messmethoden konnte keine nennenswerte IgE-Produktion nachgewiesen werden. Diese negativen Ergebnisse zeigten sich trotz zahlreicher Experimente und Ansätze.

5. Diskussion

B-Zell-Proliferation, Isotypen-*Switch* und Differenzierung zu Ig-sezernierenden B-Zellen werden durch mikrobielle Antigene induziert. TLR-Stimulation zählt neben BCR-*Triggerung* und T-Zell-Hilfe zu den entscheidenden Signalwegen, die die Entwicklung der B-Zelle beeinflussen. TLR-Stimulation selbst stellt einen wichtigen Schritt zur Plasmazellentwicklung dar.

In der bisherigen Literatur ist wenig über den Zusammenhang von IgE-*Switch* und TLR-Expression bekannt, weshalb in dieser Arbeit das TLR-Repertoire auf naiven und *memory* B-Zellen untersucht wurde. Weiterhin sollten Versuchsansätze den IgE-*Switch* *in vitro* generieren.

5.1 TLR-Expression auf B-Zellen

TLR-Stimulation ist neben BCR-*Triggerung* und T-Zell-Hilfe ein zentraler Punkt in der B-Zell-Proliferation und Differenzierung von naiven humanen B-Zellen (Ruprecht et al., 2006). Während die beiden letztgenannten Signale zusammen im Stande sind, die initiale Proliferation zu generieren, reichen sie jedoch nicht aus, um B-Zell-Proliferation zu erhalten. TLR-Stimulation ist hier zusätzlich notwendig, um Isotypen-*Switch* zu generieren und Plasmazell-Entwicklung zu steuern.

In dieser Studie wurden die TLR-Rezeptoren bezüglich ihrer Expression und in Abhängigkeit von der B-Zell-Entwicklung mittels Zellseparation und quantitativer PCR untersucht.

Zunächst zeigte sich, dass große Mengen an Spenderblut notwendig waren, um nach Isolation von PBMCs, Aufreinigung durch MACS und anschließendem Sortieren von naiven und *memory* B-Zellen ausreichende RNA-Mengen für die

PCR zu erhalten. Viele Studien, die mit B-Zellen arbeiten, isolieren diese z. B. aus Tonsillen (Mansson et al., 2006), Lymphknoten oder experimentieren mit veränderten B-Zellen. Hierzu zählen z. B. Arbeiten von Bourke et al. mit Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierten Zellen (Bourke et al., 2003), Zellen vom Burkitt-Lymphom, folliculären Lymphomen oder multiplem Myelom. Auf Grund maligner Mutation, der Veranlagung unkontrolliert zu proliferieren und des Verlustes der Apoptose-Fähigkeit, ist die Ausbeute an DNA in deutlich höherem Umfang, als durch Isolation aus peripherem Blut zu erwarten. Darüber hinaus führen zahlreiche Reaktionsschritte von PBMC-Isolation, bis hin zur finalen PCR bei den durchaus empfindlichen B-Zellen möglicherweise durch die Analysen selbst zur Apoptose und damit verbunden zum Verlust der aktiven Zellzahl. Es wird unter anderem berichtet, dass Zelldichte und Zell-Zell-Interaktion ganz entscheidende Punkte für die Aktivierung, Zellteilung und das Überleben von B-Zellen darstellen. Huggings et al. beschreibt, dass CD27-negative humane naive B-Zellen, die durch CpG-DNA-Induktion aktiviert wurden, *in vitro* den Zell-Zell-Kontakt benötigten und nur so in K562-Plasmazellen differieren (Huggings et al., 2006). CpG alleine garantiert zwar den Zellzyklus-*Reentry* und teils das Zellüberleben, jedoch liegt in der verminderten Zelldichte möglicherweise der Grund für schlechte Kulturbedingungen. Es ist durchaus denkbar, dass deshalb trotz zahlreicher Stimulationsversuche in unseren Ansätzen der *in vitro Switch* zu IgE-sezierenden Zellen nicht gelang.

Obwohl sich die Versuchsbedingungen bei niedrigen Zellzahlen im peripheren Blut diffiziler darstellen, war es gerade die Intention dieser Arbeit, diese peripheren B-Zellen aus zirkulierendem venösem Blut zu gewinnen, zu isolieren und zu untersuchen. Um ein direktes quantitatives Abbild der TLR-Expression zu erhalten, wurde von Proliferationsansätzen zur Amplifikation der B-Zellen vor der PCR-Analyse abgesehen.

Die TLR-Expression unterliegt einem ständigen dynamischen Prozess. In Abhängigkeit von mikrobiellen Antigenen, Immunstatus und allergischen Antigenen variiert die Ausprägung auf B-Zellen. Dabei ist von Interesse, ob sich die Zahl der Transkripte bezüglich Proteinsynthese ändert oder ob sich tatsächlich auf DNA-Ebene Veränderungen zeigen. In dieser Arbeit wurde die mRNA untersucht, es existieren jedoch auch Studien, die mittels Antikörper die Rezeptoren, die tatsächlich auf der Oberfläche von Zellen vorhanden sind, ermitteln (Dasari et al., 2005).

5.1.1 TLR-Expression auf B-Zellen - ein allgemeiner Überblick

Die Analysen dieser Arbeit zeigten, dass bis auf TLR9 alle untersuchten TLRs (TLR1-10) sowohl auf *memory* als auch auf naiven B-Zellen exprimiert wurden. Es ist bekannt, dass Spezies-abhängige Unterschiede bezüglich des TLR-Repertoires bestehen, die besonders beim Unterschied zwischen murinen und humanen B-Zellen untersucht wurden (Bourke et al., 2003, Bernasconi et al., 2003). In Untersuchungen von Mansson et al. konnte durch Stimulation mit LPS und Flagellin als direkte TLR-Liganden keine B-Zell-Aktivität erreicht werden, was mit der dort beschriebenen Abwesenheit von TLR4 und TLR5 in Verbindung gebracht werden kann. Im Gegensatz zu anderen Studien mit B-Zellen wo TLR3, -4, -5 und -8 nicht nachgewiesen werden konnten (Mansson et al., 2006) oder hauptsächlich TLR1 und TLR6-10 mittels mRNA Messung bestimmt wurden (Peng et al., 2005) konnte in den Analysen dieser Arbeit das Vorhandensein des gesamten TLR-Repertoires - bis auf TLR9 - nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl auf naiven als auch auf *memory* B-Zellen, jeweils bei Atopikern und gesunden Probanden, allerdings mit quantitativen

Unterschieden, auf die im Laufe der Diskussion noch genauer eingegangen wird.

Überraschenderweise konnte TLR9 in unseren Analysen nur schwach nachgewiesen werden, obwohl sich die wissenschaftliche Literatur mit TLR9 auf B-Zellen intensiv beschäftigt.

Zahlreiche Untersuchungen von TLRs auf B-Zellen berichten, dass insbesondere TLR9 und TLR10 auf humanen B-Zellen gefunden werden (Bourke et al., 2003, Dasari et al., 2005). Beide Rezeptoren zeigen einen Anstieg im Rahmen der Entwicklung von ruhenden zu aktivierten reifen B-Zellen. Verstärkte TLR9 Expression geht mit erhöhter Ansprechbarkeit bezüglich des Liganden einher. Somit wird klar, dass B-Zellen neben ihrer Rolle im erworbenen Immunsystem auch große Bedeutung bei der direkten Erkennung von Pathogenen in Assoziation zur angeborenen Immunantwort besitzen.

Es ist bekannt, dass durch TLR9-Stimulation Chemokinproduktion induziert werden kann. Wenn B-Zellen z. B. mit CpG-DNA stimuliert werden, zeigen sie mittels TLR9 verstärkte Aktivität, B-Zell-Proliferation und Expression von co-stimulatorischen Molekülen, wie IL6 und Synthese von NFκB. TLR9 wurde auf endoplasmatischem Retikulum und endozytotischen Bläschen gefunden, wo er in Interaktion mit CpG treten kann (Takeshita et al., 2001, Leifer et al., 2004). Es wird berichtet, dass gerade *memory* B-Zellen hohe Spiegel an TLR9 und TLR10 besitzen (Bernasconi et al., 2003), die durch BCR-Triggerung induziert werden können. Bourke et al. konnten auch einen Zusammenhang zwischen Ig-Produktion und TLR9-Expression nachweisen (Bourke et al., 2003).

TLR10, der phylogenetisch in engem Zusammenhang mit TLR1 und TLR6 steht, (Chuang et al., 2001) konnte in dieser Arbeit in ähnlich hohem Ausmaß, wie in der Literatur beschrieben, nachgewiesen werden (Bourke et al., 2003, Hornung

et al., 2002). Auch TLR1, TLR6 und TLR7 zeigten vergleichbare Tendenzen, wie sie bereits in anderen Publikationen zu finden sind (Hornung et al., 2002).

Bezüglich TLR9 gab es allerdings, wie erwähnt, in unseren Analysen deutliche Abweichungen von der gängigen Literatur. In keiner der untersuchten Proben konnte eine relevante Menge an spezifischer RNA von TLR9 nachgewiesen werden, obwohl doch TLR9 laut der Literatur eine zentrale Rolle bei B-Zellen darstellt.

Die Abweichung bezüglich TLR9 kann in individuellen Unterschieden der Spender begründet liegen. Da sich jedoch diese Ergebnisse bei allen Messungen zeigten und die übrigen Versuchsbedingungen bis auf den unterschiedlichen *Primer* konstant waren, könnte die Ursache auch in nicht optimaler Basensequenz des *Primers* begründet liegen. Es ist jedoch zu beachten, dass Abweichungen in der TLR-Expression immer wieder vereinzelt in Studien berichtet werden (Mansson et al., 2006 bei TLR6 und TLR8) und technische Ursachen nur eine denkbare Möglichkeit für diese Ergebnisse darstellen.

Eine Optimierung der von uns verwendeten Versuchsbedingungen wäre jedoch primär notwendig, um einen genaueren Einblick in die TLR9-Expression zu erlangen.

Eventuell ist diese niedrige TLR-Messung nur auf mRNA-Ebene zu verzeichnen und es müssten Proteinanalysen folgen, um die Ergebnisse zu verifizieren. Zudem könnten funktionelle Unterschiede oder die Notwendigkeit der Zellaktivierung für TLR-Expression den Grund für abweichende Werte von der gängigen Literatur darstellen.

Darüber hinausgehend zeigten CpG-stimulierte B-Zellen in einem Stimulationsansatz bei Hornung et al. eine sofortige Abnahme von TLR9 (Hornung et al., 2002), was diesen Rezeptor als primäres Ziel von CpG-DNA im

peripheren Blut identifiziert (Bauer et al., 2001, Krug et al., 2001, Hemmi et al., 2000). Diese Beobachtungen stehen jedoch im Gegensatz zu den Daten von Bourke et al., die durch die Stimulation eine Hochregulation des eigenen Zielrezeptors TLR9 im Rahmen eines positiven *Feedback*-Mechanismus berichten (Bourke et al., 2003).

Zunahme von TLR7, TLR9 und TLR10 kann auch nach Stimulation mit mikrobiellen Produkten wie *Staphylococcus aureus* Cowan I Bakterien und CpG-DNA oder durch Aktivierung mittels BCR und CD40 erreicht werden (Bernasconi et al., 2003).

In diesen Diskussionen wurde ebenso schlichtweg die Spendervariabilität als eine der möglichen Ursachen für das entgegengesetzte Verhalten von TLR9 proklamiert.

Somit wird deutlich, dass definitive Aussagen über Vorkommen und Menge von TLR9 schwierig sind und noch nicht mit abschließender Sicherheit gemacht werden können. Es gilt, die abweichenden Ergebnisse anhand weiterer Analysen genau zu verfolgen und zu bewerten, um durch systematische Untersuchungen breite Ergebnisse über das Expressionsmuster von TLR9 zu gewinnen.

In Übereinstimmung mit früheren Studien (Peng et al., 2005, Hornung et al., 2002, Bernasconi et al., 2003, Mansson et al., 2006, Bourke et al., 2003, Dasari et al., 2003) konnte auch bei unseren Patienten eine starke Expression von TLR1, TLR6, TLR7 und TLR10 nachgewiesen werden. TLR8 zeigte sich nur in sehr geringem Ausmaß, so wie es auch bei Mansson et al. in Untersuchungen von peripheren und tonsillären B-Zellen nicht gelang, diesen Rezeptor nachzuweisen (Mansson et al., 2006). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den meisten Studien, die mit peripheren Blutzellen gemacht wurden (Peng et al., 2005, Hornung et al., 2002, Bernasconi et al., 2003) und von TLR8-

Expression berichteten. Jedoch sind in der gängigen Literatur oft Unterschiede in der Expression der TLRs in verschiedenen Versuchsansätzen beschrieben worden, die in unterschiedlichen Bedingungen und Variationen in den Ansätzen von einer zur anderen Studie begründet liegen können. Weitergehende Analysen werden notwendig sein, um definitive Aussagen über Quantität und Zeitpunkt von konkreten Expressionsmustern zu machen.

5.1.2 TLR-Expression bei naiven versus *memory* B-Zellen

Die verhältnismäßige Expression bei naiven und *memory* B-Zellen war jeweils nahezu identisch. Naive B-Zellen zeigten ein etwas größeres quantitatives Expressionsmuster im Vergleich zu *memory* B-Zellen.

Dies gilt zumindest für den quantitativen Nachweis mittels PCR.

Es wurde bereits, wie erwähnt, in zahlreichen Studien auf die Problematik von Abweichungen zwischen PCR-Ergebnissen und Proteinnachweis mittels FACS hingewiesen (Iwasaki et al., 2004, Nagase et al., 2003). Bei Mansson et al. wurden z. B. mittels FACS-Analyse die Proteinspiegel von TLR1, TLR2, TLR7 und TLR9 auf tonsillären B-Zellen gemessen (Mansson et al., 2006). TLR2 zeigte in dieser Messung im Gegensatz zur mRNA-Bestimmung eine stärkere Ausprägung. Obwohl PCR-Techniken äußerst sensitiv sind, beweisen sie nicht die definitive Präsenz von TLRs auf der Zelloberfläche. mRNA-Transkripte zu untersuchen ist sicher nicht ausreichend, um das TLR-Repertoire abschließend zu charakterisieren. Proteinmessung und die Messung von funktioneller Aktivität ist ergänzend von Bedeutung.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Differenzierungsprozess von der naiven B-Zelle hin zur *memory* B-Zelle in unserem Kollektiv möglicherweise nur einen geringen Einfluss auf die TLR-Expression ausübt.

Es wäre denkbar, dass die naive B-Zelle, da sie früher in der Entwicklung steht, noch empfänglicher für Adjuvantien und TLR-Liganden ist und noch effektiver und variabler im Rahmen der angeborenen und damit entwicklungsgeschichtlich älteren Immunantwort reagieren kann.

Reifere B-Zellen zeigen im Verlaufe der Spezialisierung zu *memory* B-Zellen bei den von uns untersuchten Patienten ein geringeres TLR-Repertoire.

Somit könnte man vermuten, dass eine Stimulation von B-Zellen mittels TLR-Liganden besonders im Stadium der naiven B-Zelle effektiv sein könnte. Folglich ergäbe sich daraus eine Möglichkeit der TLR-Liganden-gesteuerten gezielten Stimulation und Steuerung der Immunantwort der naiven B-Zelle im Sinne von gezielter Antikörper-Produktion und Beeinflussung des *Ig-Switch*.

5.1.3 Vergleich Atopiker und Nicht-Atopiker

Zwischen Patienten und Kontrollen konnte kein nennenswerter Unterschied der TLR-Expression ermittelt werden.

Im Folgenden sollen diese Beobachtungen hypothetisch mit einem vergleichenden Ansatz in Bezug gesetzt werden.

Wie den Ergebnissen von Mansson et al. zu entnehmen ist, zeigte sich in einem Vergleich zwischen tonsillären Infektionen und hyperplastischen Tonsillen das gleiche TLR-Repertoire (Mansson et al., 2006). Grundsätzlich muss der Unterschied zwischen tonsillären und peripheren B-Zellen berücksichtigt werden und es besteht ein systematischer Unterschied zwischen bakterieller Infektion und allergischer Disposition.

Betrachtet man jedoch mikrobielle Pathogene als potentielle Liganden von TLRs, so ist prinzipiell eine Stimulation der TLRs mittels Liganden wie Peptidoglykan (TLR2), Poly I:C (TLR3), LPS (TLR4), Flagellin (TLR5), CpG-DNA (TLR9) möglich. Darüber hinaus scheint es denkbar, dass Allergene direkt oder

als intermediäre Transmittoren TLRs aktivieren können (Trompette et al., 2009, Schmidt et al., 2010). So wurde kürzlich Nickel, eines der verbreitetsten Kontaktallergene, als Ligand von hTLR4 identifiziert (Schmidt et al., 2010). Möglicherweise können Allergene bei Atopikern mit überschießender Immunantwort ähnlich wie bekannte TLR-Liganden zur Stimulation der Signaltransduktionskaskade über TLRs führen mit der Aktivierung von Gentranskription, Produktion von inflammatorischen Zytokinen (TNF, IL1, IL12), Chemokinen (IL8, MCP-1, RANTES), endothelialen Adhäsionsmolekülen (E-Selectin) und co-stimulatorischen Molekülen CD 80 und CD 86. Ein quantitativer Unterschied zwischen Atopikern und gesunden Probanden ist jedoch auf Ebene der TLR-Expression in unserem Kollektiv nicht gefunden worden.

Dazu passend konnten auch bei anderen Zelltypen, wie z. B. DCs bezüglich der Basis-Expression von TLRs keine nennenswerten Differenzen zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern verzeichnet werden (Terhorst et al., 2006). Auch in dieser vergleichenden Arbeit wurden ähnliche quantitative Basis-Expressionsmuster von TLRs in beiden Gruppen gefunden, mit starker Expression von TLR2, -4, -5, -6 und -8. Weiterhin wurde TLR9, wie bei uns, und zudem TLR7 und -10 nur in geringem Maße nachgewiesen. Erst nach Stimulationsansätzen ergaben sich Unterschiede bezüglich der Hochregulation von co-stimulatorischen Molekülen wie CD 80, CD 83 und CD 86. Neben rein quantitativen Unterschieden in der TLR-Expression könnten weitere Stimulationssignale (wie z.B. TSLP), das TH₂-dominante Zytokinmilieu oder epigenetische Veränderungen in den TLR-kodierenden Sequenzen unterschiedliche Inflamationsreaktionen erklären.

Da es sich bei den untersuchten Atopikern um Patienten in nicht-exazerbierten Stadien des Ekzems handelte und zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine

aktuelle Exposition bezüglich ihrer jeweiligen sensibilisierten Antigene zu verzeichnen war, könnte auch der fehlende allergene Reiz die fehlenden Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen erklären. Da es sich bei der Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene um einen dynamischen Prozess handelt, der vom momentanen Milieu und Aktivierungsstimuli abhängig ist, müssten Vergleiche von exponierten Allergikern mit klinischen Symptomen und klinisch stabilen Patienten folgen, um festzustellen, ob die TLR-Expression vom momentanen klinischen Ausprägungsgrad der allergischen Symptome abhängt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die bekannte genetische Prädisposition von Atopikern zu überschießender Immunantwort wohl nicht in einem unterschiedlichen oder erhöhten Basislevel an TLRs begründet zu liegen scheint.

Ebenfalls zeigen unsere Ergebnisse bezüglich der TLR-Expression Unterschiede zu B-Zellen bei malignen Erkrankungen, wie beim multiplen Myelom oder Lymphomen mit B-Zell-Ursprung. Diese Zellreihen zeigen, wie auch EBV-infizierte B-Zellen, hohe Spiegel an TLR9 und TLR10, was die Hypothese verstärkt, dass diese Rezeptoren entscheidend an Differenzierung und Reifung beteiligt sind (Bourke et al., 2003).

Wachstumsstimulation mittels TLR trägt somit zur Verbindung von chronischen Infektionen, Inflammation und der Entartung zu malignen Zellen hin bei (Balkwill et al., 2001, Mantovani et al., 2002, Mazzuchelli et al., 1999).

5.2 B-Zellen mit Klassenswitch zu IgE

Zellisolationen und Charakterisierung von basaler und induzierbarer Expression mit verschiedenen Ansätzen stellen den Schlüssel dar, um TLR-Funktion zu verstehen. Trotz zahlreicher Stimulationsversuche mit IL-4, IL-13, IL-21, CD40L und CD40L-positiven Insekten-Membranen (freundlicherweise von Dr. Tangye

zur Verfügung gestellt) in verschiedenen Kombinationen konnte der Ig-Klassenswitch nicht induziert und mittels ELISA und ELISPOT kein IgE nachgewiesen werden. Die Ursache für diese Tatsache konnte nicht evaluiert werden.

Obwohl andere Studien unter vergleichenden Bedingungen positive Ergebnisse verzeichnen (Avery et al., 2008), müssen die Bedingungen für die B-Zellen in dieser Arbeit nicht optimal für den Switch gewesen sein. Eine mögliche Erklärung bietet die geringe Zellzahl. Obwohl alle Reagenzien vorhanden waren, die den optimalen Switch zu IgE-produzierenden Zellen generieren sollten, benötigen B-Zellen, wie bereits erwähnt, intensiven und engen Zell-Zell-Kontakt, um diese Entwicklung zu vollziehen (Huggings et al., 2006). In dieser Publikation wird beschrieben, dass die Proliferation von CD27-negativen B-Zellen nur dann geschieht, wenn in Zellkultur eine hohe Dichte an Zell-Zell-Kontakt besteht. Auch in anderen Publikationen wird gezeigt, dass humane B-Zellen unter geringer Zelldichte in Kulturbedingungen nicht proliferieren (Bernasconi et al., 2002, He et al., 2004, Gantner et al., 2003). Enger Zell-Zell-Kontakt optimiert die Fähigkeit von CD40-CD40L-Interaktion zwischen B-Zellen und verstärkt dabei die Proliferation und Differenzierung nach TLR9-Signalinduktion.

Wie bereits beschrieben, handelte es sich bei unserem Untersuchungsmaterial um sehr geringe Zellzahlen, die darüber hinaus in zahlreichen Separationsschritten möglicherweise bereits geschädigt wurden. B-Zellen sind sehr empfindlich und in Kultur sind für Differenzierung, Reifung und Zellteilung sowohl optimale Bedingungen, als auch das richtige zeitliche Zusammenspiel zwischen BCR-Stimulation, T-Zell-Hilfe, Zytokinen und TLR-Stimulation notwendig. Folglich ist es durchaus denkbar, dass die Zellen frühzeitig Apoptose betrieben oder schlichtweg keinen Switch durchgeführt hatten.

Ergänzend wird in anderen Publikationen die Abhängigkeit der Plasmazellendifferenzierung und damit verbunden der Antikörperproduktion von verschiedenen Faktoren beschrieben, wie z. B. lokale Faktoren im KIM inklusive IL-6 (Jego et al., 2001, Klein et al., 2003, Matsui et al., 2003, Sneed et al., 1994), IL-21 (Ozaki et al., 2004, Klein et al., 2003, Derksen et al., 2002) und INF α (Klein et al., 2003, Matsui et al., 2003). Möglicherweise sind Signale an CD138 durch *Insulin-like-growth-factor* und humaner Hepatozyten-Wachstumsfaktor (hHGF) weitere Faktoren, die die Stimulation verbessern und die Apoptose der B-Zelle verhindern könnten (Huggins et al., 2006).

Unter der Annahme, dass es sich bei der Bestimmung von TLR9 mit niedrigen Werten um keinen technischen Messfehler handelt, sondern die tatsächliche Expression dieses Rezeptors wiedergegeben wird, scheint eine verminderte Stimulierbarkeit von B-Zellen wahrscheinlich. TLR9 selbst nimmt nämlich die zentrale Bedeutung bei der Aktivierung von humanen naiven B-Zellen und der Differenzierung zu Plasmazellen unter geeigneten Zytokinen und Wachstumsfaktoren ein.

5.3 Impfstoffadjuvantien - TLR-Liganden in der Therapie

B-Lymphozyten sind für ihre Rolle bezüglich der erworbenen Immunantwort als spezifische Antikörper-produzierende Zellen bekannt. Jedoch ergibt sich durch den in dieser Arbeit durchgeführten Nachweis von TLRs eine neue Betrachtungsweise der Funktion dieser Zellen. Vielmehr stellen sie eine regulative Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunweg dar.

Mittels TLR-Stimulation sind B-Zellen in der Lage eine Reihe von Zytokinen zu produzieren, wie von Agrawal et al. in einer systematischen Untersuchung

2011 belegt wurde (Agrawal et al., 2011). In diesen Untersuchungen konnte die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Hämatopoetischem Wachstumsfaktor durch Stimulation mit TLR-Liganden erreicht werden. Pam3CSK4 als TLR1- und -2-Ligand, Imiquimod, als typischer TLR7-Ligand und CpG-ODN als TLR9-Ligand. All diese Liganden waren in der Lage B-Zellen zu aktivieren. Der größte Anteil wurde von *memory* B-Zellen produziert.

Daraus ergibt sich einhergehend mit unseren Analysen, in denen wir ebenfalls TLRs bei naiven und *memory* B-Zellen feststellen konnten und diese auch bei Atopikern regelrecht zu finden sind, die Notwendigkeit der gezielten Suche nach geeigneten TLR-Liganden, welche die Immunantwort speziell bei Atopikern gezielt beeinflussen können.

Wie bereits klinisch erfolgreich am Beispiel Imiquimod, einem TLR7 Agonisten, mit Aldara® erfolgreich durch gezielte Inflamationsreaktion die aktinischen Keratosen als Vorstufen des Spinozellulären Karzinoms bekämpft werden können (Stockfleth et al., 2002), ist eine Beeinflussung des Zytokinmilieus bei Atopikern denkbar. Das prinzipiell vorherrschende TH₂-Milieu, das mit Produktion von IL4, IL5 und IL13 zu den klinischen Ausprägungen der Atopie führt, könnte mit gezielter TLR-Liganden-Stimulation oder Inhibition zur TH₁-Dominanz gebracht werden.

IL13, welches von TH₂-Helferzellen produziert wird, ist an der Reifung und Differenzierung von B-Zellen maßgeblich beteiligt und führt zu Hochregulation von CD23, MHC-II-Expression und bewirkt den IgE-Isotypen-*Switch* in B-Zellen. Zudem wird Makrophagen-Aktivität herunter reguliert und das pro-inflammatorische Zytokinmilieu inhibiert. Außerdem trägt es entscheidend zur Entwicklung von allergen-induziertem Asthma bei. Agrawal et al. konnten in ihren Analysen eine IL13-Produktion vor allem nach TLR1/TLR2-Stimulation mittels Pam3CSK nachweisen (Agrawalet al., 2011). Denkbar wäre eine gezielte Modulation des TLR2-Signals als potentielle Möglichkeit die IL13-Produktion zu

begrenzen. Ein Allergie-protectives TH₁-Milieu scheint ein weiterer möglicher Ansatzpunkt, die klinischen Symptome von Allergikern zu mildern.

Agrawal et al. konnten durch Stimulation von TLR1, TLR2, TLR7 und TLR9 pro-inflammatorische Zytokine, IL1 α , IL1 β , IL6 und TNF α , nachweisen (Agrawal et al., 2011). Möglicherweise ist auch ein *Priming* der B-Zelle mit primären Liganden möglich, um im Sinne einer Impfung die TLR- Immunantwort zu beeinflussen.

Um spezifische Methoden zu entwickeln, die Immunantwort des Atopikers therapeutisch mittels TLR-Liganden zu beeinflussen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Da es sich bei dem Zusammenspiel der TLRs, ihrer Liganden und des resultierenden Zytokinmilieus um ein sehr sensibles Zusammenspiel handelt, ist es wichtig die genauen Auswirkungen von TLR-Stimulation und Inhibition zu verstehen, um dieses Gleichgewicht gezielt zu Gunsten des atopischen Patienten beeinflussen zu können. Es handelt sich jedoch um einen viel versprechenden therapeutischen Ansatzpunkt, der auch bei bereits klinisch bestehenden Krankheitssymptomen angewandt werden könnte.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass das gesamte TLR-Repertoire, bis auf TLR9, sowohl auf naiven, als auch auf *memory* B-Zellen gefunden werden kann. In unserem Probenmaterial existierte kein Unterschied bezüglich der TLR-Expression während der B-Zell-Differenzierung. Stimulationsansätze würden das Spektrum wahrscheinlich verändern, ergaben jedoch nicht den gesuchten *Klassenswitch*. Um Zusammenhänge zwischen dem *IgE-Switch* und den TLRs zu ermitteln, muss zunächst der *IgE-Switch* in vitro zuverlässig etabliert werden.

Es zeigten sich keine Differenzen zwischen Atopikern und gesunden Probanden, was eine grundsätzliche Abweichung der Basisausstattung an TLRs unwahrscheinlich macht.

Besonders stark wurde TLR6, TLR7 und TLR10 exprimiert, was mit der gängigen Literatur übereinstimmt, gefolgt von TLR1, TLR2, TLR3 und TLR4.

Es wurde die Bedeutung der Rolle dieser wichtigen Rezeptoren für einen möglichen therapeutischen Ansatz in Zukunft deutlich gemacht. TLRs sind auf Grund ihrer Vielfalt und ihrer zentralen Schlüsselrolle im Immunsystem Gegenstand zahlreicher Forschungen. Deutlich zeigt sich die Notwendigkeit von weiteren Versuchen, um den Zusammenhang zwischen Klassen-*Switch* und TLRs besser zu verstehen. Darüber könnten sich aus diesen Ergebnissen weitere Untersuchungen bei Patienten mit atopischer Disposition ergeben, um die Zusammenhänge zwischen Immunsystem, TLRs und Krankheitsbild besser zu verstehen. Möglicherweise bietet ein besseres Verständnis der immunologischen und pathogenetischen Zusammenhänge die Grundlage, um Therapieansätze auf TLR-Ebene zu entwickeln, die Menschen mit atopischen Erkrankungen in Zukunft helfen werden.

6. Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. (2009). *Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System*. Third edition. Elsevier Verlag. Philadelphia.

Agrawal S., Gupta S. (2011) TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *J. Clin. Immunol.* 31: 89-98.

Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical protein link in innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2: 675-680.

Akira, S. (2003). Mammalian toll-like receptors, *Curr. Opin. Immunol.* 15: 5-11.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.

Amlie-Lefond, C., Paz, D. A., Connelly, M. P., Huffnagle, G. B., Dunn, K. S., Whelan, N. T., Whelan, H. T. (2005). Innate immunity for biodefense: a strategy whose time has come. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 1334-1342.

Anderson, K. V., Bokla, L., Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42: 791-798.

Anderson, K. V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 13-19.

Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C. Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L., Schwartz, D. A. (2000). TLR-4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.* 25: 187-91.

Avery, D. T., Ma, C. S., Bryant, V. L., Santner-Nanan, B., Nanan, R., Wong, M., Fulcher, D. A., Cook, M. C., Tangye S. G. (2008). STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells. *Blood.* 112: 1784-1793.

Balkwill, F., Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 539-545.

Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9237-9242.

Bernasconi, N. L., Traggiai, E., Lanzavecchia, A. (2002) Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298: 2199–2202.

Bernasconi, N. L., Onai, N., Lanzavecchia, A. (2003). A role for Toll-like receptors in acquired immunity: upregulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B-cells. *Blood* 11: 4500-4504.

Biragyn, A., Surehnu, M., Yang, D., Ruffini, P. A., Haines, B. A., Klyushenkova, E., Oppenheim, J. J., Kwak, L. W. (2002). Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with non-immunogenic target antigens. *J. Immunol.* 167: 6644-6653.

- Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N., Mantovani, A.** (2003). The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR 10 in normal and transformed cells. *Blood* 102: 956-963.
- Burrows, P. D., Schroeder, H. W., Cooper, M. D.** (1995). B-cell differentiation in humans. *Immunoglobulin Genes* (2Edition). Academic Press, San Diego, California, USA. 1: 3-25.
- Burrows, P. D., Cooper, M. D.** (1997). B cell development and differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 239-244.
- Bustin S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G., L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T.** (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55: 611-22.
- Chuang, T., Ulevitch, R. J.** (2001). Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1518: 157-161.
- Cohen-Sfady, M., Nussbaum, G., Pevsner-Fischer, M., Mor, F., Carmi, P., Zanin-Zhorov, A., Lider, O., Cohen, I. R.** (2005). Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *J. Immunol.* 175: 3594-3602.
- Coombs, R. R. A., Gell, P. G. H.** (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. In *Clinical Aspects of Immunology*, (Philadelphia, Davis): 317.
- Dasari, P., Nicholson, I. C., Hodge, G., Dandie, G. W., Zola, H.** (2005). Expression of toll-like receptors on B-Lymphocytes. *Cell. Immunol.* 236: 140-145.
- Derksen, P. W., Keehnen, R. M., Evers, L. M., van Oers, M. H., Spaargaren, M., Pals, S.T.** (2002). Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood* 99: 1405–1410.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C.** (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529-1531.
- Eaves-Pyles, T., Murthy, K., Liaudet, L., Virag, L., Ross, G. Soriano, F. G., Szabo, C., Salzman, A.L.** (2001). Flagellin, a novel mediator of *Salmonella*-induced epithelial activation and systemic inflammation: I κ B α degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J. Immunol.* 166: 1248–1260.
- Ellwart, J. W.** (2000). Sortierprinzip mit dem Cellsorter. www.cell-sorter.de
- Fitzgerald, K. A., O'Neill, L. A.** (2000). The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defense. *Microbes Infect.* 2: 933-943.
- Fluckiger, A., Sanz, E., Garcia-Lloret, M., Su, T., Hao, Q., Kato, R., Quan, S., de la Hera, A., Crooks, G. M., Witte, O. N., Rawlings, D. J.** (1998). In vitro reconstitution of human B-cell ontogeny: from CD34+ multipotent progenitors to Ig-secreting cells. *Blood* 92: 4509-4520.
- Gantner, F., Hermann, P., Nakashima, K., Matsukawa, S., Sakai, K., Bacon, K. B.** (2003). CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur. J. Immunol.* 33: 1576–1585.

- Gelman, A. E., Zhang, J., Choi, Y., Turka, L. A.** (2004). Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4⁺ T cell survival, *J. Immunol.* 172: 6065-6073.
- Guillot, L., Balloy, V., McCormac, F. X., Golenbock, D. T., Chignard, M., Si-Tahar, M. Cutting** (2002). The immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like-receptor 4. *J. Immunol.* 168: 5989-5992.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., Anderson, K. V.** (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52: 269-279.
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., Schölmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., Rogler, G.** (2002). Toll-like receptors 2 and 4 are upregulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122: 1987–2000.
- 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: 1099-1103.
- He, B., Qiao, X., Cerutti, A.** (2004). CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J. Immunol.* 173: 4479–4491.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., Bauer, S.** (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 33: 2987-2997.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S.** (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-1529.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S.** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O.** (2002). Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3: 196-200.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H.** (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280.
- Holzappel, B., Wickert, L.** (2007). Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit.* 37 : 120-126.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, A., Hartmann, G.** (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodesoxynucleotids, *J. Immunol.* 168: 4531-4537.

- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999).** Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162: 3749-3752.
- Huggins, J., Pellegrin, T., Felgar, R. E., Wei, C., Brown, M., Zheng, B., Milner, E. C., Bernstein, S. H., Sanz, I., Zand, M.S. (2006).** CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27- naive human B cells. *Blood* 109: 1611-9.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R. (2004).** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5: 987–95.
- Janeway, C. A. Jr., Travers, P. (1997).** *Immunobiology: The Immune system in Health and Disease.* 2nd edition; Garland Publishing. New York.
- Jego, G., Bataille, R., Pellat-Deceunynck, C. (2001).** Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 97: 1817–1822.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., Bauer, S. (2002).** Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* 3: 499.
- Kaisho, T., Akira, S. (2002).** Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1589: 1-13.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., Coffman, R. L. (2007).** Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat. Med.* 13: 552-559.
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., Weissman, D. (2004).** mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *Biol. Chem.* 279: 12542-12550.
- Kawai, T., Akira, S. (2010)** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 11: 373-384.
- Kimura, M., Tsuruta, S., Yoshida, T. (1998).** Unique profile of IL-4 and IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells in infants with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102: 238-244.
- Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K. (1993).** Human IgM⁺IgD⁺ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V kappa genes with no or little somatic mutation throughout life. *Eur. J. Immunol.* 23: 3272-3277.
- Klein, U., Rajewsky, K., Küppers, R. (1998).** Human immunoglobulin IgM+IgD+ peripheral Blood B cells expressing the CD27 cell surface carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated memory B cells. *J. Exp. Med.* 188: 1679-1689.
- Klein, B., Tarte, K., Jourdan, M., Mathouk, K., Moreaux, J., Jourdan, E., Legouffe, E., De Vos, J., Rossi J. F. (2003).** Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *Int. J. Hematol.* 78: 106-113.
- Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G. S., Xu, D., Liew, F. Y. (2004).** TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3029-3034.

- Krieg, A. M.** (2007). Antiinfective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proc. Am. Thorac Soc.* 4: 289-294.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S.** (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40Ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 31: 3026-3037.
- Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J., Marshak Rothstein, A.** (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416: 603-607.
- Lee, L. G., Connell, C. R., Bloch, W.** (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl. Acids. Res.* 21: 3761-3766.
- Leifer, C. A., Kennedy, M. N., Mazzoni, A., Lee, C., Kruhlak, M. J., Segal, D. M.** (2004). TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J. Immunol.* 173: 1179-1183.
- Liu, Y. J.** (1997). Tracing antigen-driven B cell development in humans. *Chem. Immunol.* 67: 14-26.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A.** (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23: 549-555.
- Mansson, A., Adner, M., Höckerfelt, U., Cardell, L. O.** (2006). A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by Pam₃CSK₄ and CpG-2006 stimulation. *J. Immunol.* 118: 539-548.
- Manz, R. A., Thiel, A., Radbruch, A.** (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388: 133-134.
- Matsui, W., Huff, C. A., Vala, M., Barber, J., Smith, B. D., Jones, R. J.** (2003). Anti-tumour activity of interferon-alpha in multiple myeloma: role of interleukin 6 and tumor cell differentiation. *Br. J. Haematol.* 121: 251-258.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., Seya, T.** (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* 171: 3154-3162.
- Mazzucchelli, L., Blaser, A., Kappeler, A., Schärli, P., Laissue, J. A., Baggolini, M., Uguccioni, M.** (1999). BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J. Clin. Invest.* 104: 49-54.
- Medzhitov, R.** (2001). Toll-like Receptors and innate immunity. *Nature Reviews* 1: 135-145.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T.** (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102: 553-563.
- Muzio, M., Mantonai, A.** (2000). Toll-like receptors. *Microbes Infect.* 2: 251-255.
- Nagase, H., Okugawa, S., Ota, Y., Yamaguchi, M., Tomizawa, H., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., Hirai, K.** (2003). Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J. Immunol.* 171: 3977-82.

- Nakazawa, M., Sugi, N., Kawaguchi, H., Ishii, N., Nakajima, H., Minami, M.** (1997). Predominance of type 2 cytokine-producing CD4+ and CD8+ cells in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 99: 673-682.
- Nicholson, I. C., Brisco, M. J., Zola, H.** (1995). Memory B lymphocytes in human tonsil do not express surface IgD. *J. Immunol.* 154: 1105-1113.
- Nuñez, C., Nishimoto, N., Gartland, G. L., Billips, L. G., Burrows, P. D., Kubagawa, H., Cooper, M. D.** (1996). B cells are generated throughout life in humans. *J. Immunol.* 156: 866-872.
- Nüsslein-Volhard, C., Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E.** (1991). The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 31:725-735.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C., Strauss, J. F.** (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276: 10229-10233.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H., Wang, G., Qi, Ch., Hwu, P., Shaffer, D. J., Akilesh, S., Roopenian, D. C., Morse, H. C. Lipsky, P. E., Leonard, W. J.** (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J. Immunol.* 173: 5361-5371.
- Park, J. S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., Svetkauskaite, D., Kim, J. Y., Strassheim, D., Sohn, J. W., Yamada, S., Maruyama, I., Banerjee, A., Ishizaka, A., Abraham, E.** (2006). High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Physiol.* 290: 917-924.
- Parronchi, P., Macchia, D., Piccinni, M. P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E. R. M., Ansari, A. A., Romagnani, S.** (1991). Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clone established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4538-4542.
- Peng, S. L.** (2005). Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 230-236.
- Pezzuto, A., Ulrichs, T., Burmester, G. R.** (2007). Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen-Labor-Klinik. 2. Vollständig aktualisierte und überarbeitete Auflage. Thieme Verlag. Stuttgart.
- Pfaffl, M. W.** (2004). Real-Time RT-PCR. Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum. Sonderausgabe PCR* 10: 92-95.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B.** (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088.
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., Malo, D.** (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* 189: 615-625.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L. D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., Durandy, A.** (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2) *Cell* 102: 565-575.

- Ring, J.** (2004). *Angewandte Allergologie*. 3. Auflage edn. Urban & Vogel Verlag. München.
- Rui, L., Vinuesa, C. G., Blasioli, J., Goodnow, C. C.** (2003). Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nat. Immunol.* 4: 594-600.
- Ruprecht, C. R., Lanzavecchia, A.** (2006). Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *J. Immunol.* 36: 810-816.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A.** (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290: 92-97.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sato, S., Nomura, F., Kawai, T., Takeuchi, O., Muhlradt, P. F., Takeda, K., Akira, S.** (2000). Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J. Immunol.* 165: 7096-7101.
- Schild, A.** Einführung in die TaqMan[®] PCR-Technologie. 7700 SDS Workshop: 1-117. Version 2.1. Applied Biosystems GmbH. Weiterstadt.
- Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P.J., Galanos, C., Roth, J., Skerra, A., Martin, S.F., Freudenberg, M.A., Goebeler, M.** (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol.* 11: 814-819.
- Schröder, N. W., Schumann, R. R.** (2005). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect. Dis.* 5: 156-164.
- Skountzou, I., Martin Mdel, P., Wang, B., Ye, L., Koutsonanos, D., Weldon, W., Jacob, J., Compans, R.W.** (2010) Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine.* 28: 4103-4112.
- Smiley, S. T, King, J. A, Hancock, W. W.** (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 167: 2887-2894.
- Sneed, T. B., Stanley, D. J., Young, L. A., Sanderson, R. D.** (1994). Interleukin-6 regulates expression of the syndecan-1 proteoglycan on B lymphoid cells. *Cell Immunol.* 153: 456-467.
- Stockfleth, E., Meyer, T., Benninghoff, B., Salasche, S., Papadopoulos, L., Ulrich, C., Christophers, E. A.** (2002) randomized, double-blind, vehicle-controlled study to assess 5% imiquimod cream for the treatment of multiple actinic keratoses. *Arch. Dermatol.* 138: 1498-502.
- Su, S. L., Tsai, C. D., Lee, C. H., Salter, D. M., Lee, H. S.** (2005). Expression and regulation of Toll-like receptor 2 by IL-1beta and fibronectin fragments in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 879-886.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S.** (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335-376.

- Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M., Klinman, D. M.** (2001). Role of toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J. Immunol.* 167: 2555-2558.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S.** (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451.
- Tangye, S. G., Liu, Y. J., Aversa, G., Phillips, J. H., de Vries, J. E.** (1998). Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* 188: 1691-1703.
- Terhorst, D., Kalali, B. N., Weidinger, S., Illig, T., Novak, N., Ring, J., Ollert, M., Mempel, M.** (2007). Monocyte derived dendritic cells from highly atopic individuals are not impaired in their pro-inflammatory response to toll-like receptor ligands. *Clin. Exp. Allergy* 37: 381- 90.
- Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., Simon, J. C.** (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 195: 99-111.
- Tew, J. G., Burton, G. F., Szakal, A. K., Kosco, M. H.** (1988). A subpopulation of germinal center B cells differentiate directly into antibody forming cells upon secondary immunization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 237: 215-220.
- Tighe, H., Takabayashi, K., Schwartz, D., Van Nest, G., Tuck, S., Eiden, J. J., Kagey-Sobotka, A., Creticos, P. S., Lichtenstein, L. M., Spiegelberg, H. L., Raz, E.** (2000) Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol.* 106: 124-134
- Tierens, A., Delabie, J., Michiels, L., Vandenberghe, P., de Wolf-Peeters, C.** (1999). Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. *Blood* 93: 226-234.
- Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R. S., Madan, R., Thorne, P. S., Wills-Karp, M., Gioannini, T. L., Weiss, J. P., Karp, C. L.** (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature.* 457: 585-588
- Tsan, M. F., Baochong, G.** (2007). Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 13: 6-14
- Ulevitch, R. J., Tobias, P. S.** (1995). Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 437-457
- Van Reijssen, F. C., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Kalthoff, F. S., Maggi, E., Romagnani, S., Westland, J. K. T., Mudde, G. C.** (1992). Skin-derived aeroallergen-specific T cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 90: 184-192.
- Viau, M., Zouali, M.** (2005). B-Lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clin.Immunol.* 114: 17-26.
- Viglianti, G. A., Lau, C. M., Hanley, T. M., Miko, B. A., Shlomchik, M. J., Marshak-Rothstein, A.** (2003). Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity.* 19: 837-847.

Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K., Segal, D. M. (2001). Regulation of toll-like receptors in human Monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166: 249-255.

Wagner, H. (2002). Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 62-69.

Watson, J. D., Crick, F. H. C. (1953). A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171: 737-738.

Wierenga, E. A., Snoek, M., deGroot, C., Chretien, I., Bos, D. J., Jansen, H. M. (1990). Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4⁺ T-lymphocytes in atopic patients. *J. Immunol.* 144: 4651-4656.

Xu, W., Santini, P. A., Matthews, A. J., Chiu, A., Plebani, A., He, B., Chen, K., Cerutti, A. (2008) Viral double-stranded RNA triggers Ig class switching by activating upper respiratory mucosa B cells through an innate TLR3 pathway involving BAFF. *J Immunol.* 181: 276-87.

7. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des TLR-Repertoires auf B-Zellen mit erwartetem Immunglobulin-Klassen-*Switch*.

Das Probenmaterial stellten B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Spendern dar. Dabei wurden ein Vergleich von Atopikern und Nicht-Atopikern und eine Unterscheidung der TLR-Expression von naiven und *memory* B-Zellen angestrebt. Die Analyse wurde mittels RNA-Gewinnung und anschließender PCR durchgeführt. Zunächst wurden die *Primer* hierfür am Probenkollektiv der Keratinozyten etabliert und konnten dann in der Untersuchung von B-Lymphozyten-cDNA Anwendung finden.

Bezüglich der TLR-Expression auf B-Zellen konnte gezeigt werden, dass grundsätzlich das gesamte Spektrum von TLR1 bis TLR10 auf B-Lymphozyten vorhanden ist. Auffällig war die sehr schwache Expression von TLR9. Dies trifft sowohl für naive, als auch für *memory* B-Zellen zu. Es konnten keine Unterschiede zwischen Atopikern und gesunden Probanden festgestellt werden, was aber möglicherweise am klinischen Erscheinungsbild oder mangelnder Antigenexposition lag.

Stimulationsansätze wiesen nicht den erwarteten *Switch* zu IgE-produzierenden B-Zellen auf, was an geringer Zell-Zahl, schlechten Kulturbedingungen oder fehlenden Stimulationsfaktoren gelegen haben könnte.

Weiterführende Analysen und Studien über diese komplexen Zusammenhänge sind in Zukunft notwendig.

8. Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2, 2-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolin)-6-Sulfonsäure
AID	<i>Activation-Induced-Cytidin-Deaminase</i>
AKP	Alkaline Phosphatase
AMV	<i>Avian-Myeloblastosis-Virus</i>
AP-1	Aktivierungs-Protein 1
AP-Zellen	Antigen-präsentierende-Zellen
APC	Allophycocyanin
BCIP/NBT	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat/Nitro-Tetrazolium-Blue-Chlorid
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CDR	Komplementaritäts-Determinierende Regionen
CpG-DNA	Unmethylierte Nukleotidstränge mit Cytosin-Guanin-Motiven
C _T -Wert	<i>Threshold-Cycle</i>
DAG	Diacylglycerin
DC	<i>Dendritic Cell</i>
Derm. pter.	Dermatophagoides pteronyssius
DNA	<i>Desoxyribonuklein-Acid</i>
dsRNA	Doppelstrang- RNA
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunoabsorbant-Assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Technique</i>
ERK	Extrazelluläre Signalregulationskinase
FACS	<i>Fluoreszenz-Associated-Cell-Sorting</i>
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FcεRI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
FCS	<i>Fetal-Calf-Serum</i>
FDC	<i>Follicular-Dendritic-Cell</i>
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
FSC	<i>Forward-Scatter</i>
GAPDH	Glycerin-Aldehydphosphat-Dehydrogenase
GTP/GDP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
hHGF	Humaner Hepatozyten-Wachstumsfaktor

HIV	Humanes-Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes-Leukozytenantigen
HMGB 1	<i>High-Mobility-Group-Box-1-Protein</i>
HRP	<i>Horse-Raddish-Peroxidase</i> (Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase)
HSP	Hitzestress-Protein
ICAM	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IRAK	IL-Rezeptor-Assoziierte-Kinase
ITAM	<i>Immunoreceptor-Tyrosin-based- activation motif</i>
JAM	Junktionale Adhäsionsmoleküle
JNK	Junktionale N-terminale Kinase
KNM	Knochenmark
LBP	LPS-bindendes-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leukozytenreiche <i>Repeats</i>
LTA	<i>Lipoteichoic-Acid</i>
MACS	<i>Magnet-Associated-Cell-Sorting</i>
MALT	Mukosa-Assoziiertes Lymphatisches Gewebe
MHC	<i>Major-Histokompatibility-Complex</i>
MPO	Myeloperoxidase
MyD88	<i>Myeloid-Differentiation-Factor 88</i>
min	Minute
Myc	Transkriptionsfaktor/Protoonkogen
NaCl	Natriumchlorid
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-Cells</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NOS	Stickstoffoxidsynthetase
NTC	<i>No-Template-Control</i>
NTP	Nukleotid-Triphosphat
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodinukleotid
OPD	Orthophenylendiamin
PAMP	<i>Pathogen-Associated-Molecular-Pattern</i>
PBMC	<i>Peripher-Blood-Mononuclear-Cell</i>
PBS	<i>Phosphat-Buffered-Saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>

PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C- γ
Poly I:C	<i>Polyinosic-Polycytidylic-Acid</i>
Pro-B-Zelle	Progenitor-B-Zelle
PRR	<i>Pattern-Recognition-Receptor</i>
PWM	Pulsweitenmodulation
R-848	Resiquimod 848
RNA	<i>Ribonucleinacid</i>
ROS	<i>Reactive-Oxygen-Species</i>
rpm	<i>Rounds Per Minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute (Medium)</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-Time-PCR</i>
SCC	<i>Sidescatter</i>
SNP	<i>Single-Nukletide-Polymorphisms</i>
SP-A	<i>Surfactant-Protein- A</i>
ssRNA	<i>Single-Stranded-RNA</i>
Syk	<i>Spleen-Tyrosin-Kinase</i>
Tab	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>Transforming-Growth- Factor</i>
TIR	Toll/IL-Rezeptor
TLR	<i>Toll-Like-Rezeptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
Tween 20	Poly(oxyethylen) _n -Sorbitant-Monolaurat

9. Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Martin Mempel, für die hervorragende und exzellente Betreuung meiner Arbeit danken. Er hat mich stets unterstützt, mich an wissenschaftliches Arbeiten herangeführt und mir durch sein umfassendes Wissen tiefgreifende Einblicke in die Thematik gegeben. Herzlichen Dank für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Ollert danke ich für die freundliche Zusammenarbeit, das Interesse an meiner Arbeit und die weiterführenden Diskussionen.

Herrn Behnam Naderi Kalali danke ich für die anfängliche Hilfe und die geduldige Unterstützung beim Erlernen von wichtigen analytischen Methoden.

Kerstin Holtz, Gaby Roth und Beate Heuser danke ich für die freundliche und tatkräftige Hilfe.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des ZAUM für die Möglichkeit, dass ich einen Teil meiner Analysen dort durchführen konnte und besonders bei Cornelia Blume für die umfangreiche Betreuung meiner Arbeit.

Großer Dank gilt auch Dr. Joachim W. Ellwart für die Benutzung des *Cell-Sorters*. Ohne diese Technik wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Ring bin ich dankbar, dass ich meine Arbeit und meine wissenschaftliche Ausbildung an seiner Klinik absolvieren durfte.

Zudem danke ich allen Patienten und Probanden für ihre Teilnahme.

Ich danke Kilian Mentner, der immer für mich da ist.

Mein größter Dank geht an meine Eltern und Großeltern, die mir immer zur Seite stehen, mich stets förderten und unterstützten. Mit unendlicher Selbstverständlichkeit und Liebe haben sie mir so vieles ermöglicht. Danke.